

25.11.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

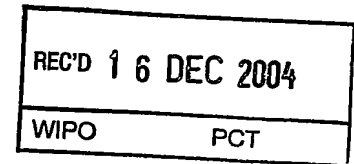
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年11月27日

出願番号  
Application Number: 特願2003-396828  
[ST. 10/C]: [JP2003-396828]

出願人  
Applicant(s): エーザイ株式会社  
メルシャン株式会社

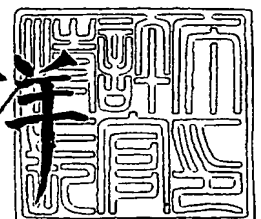


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川 洋



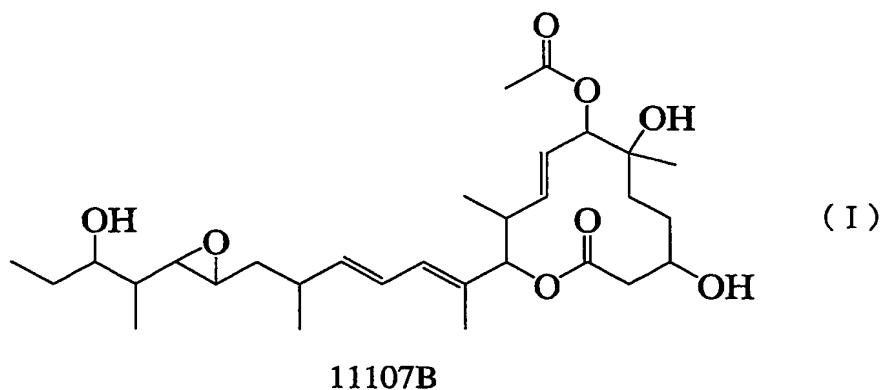
【書類名】 特許願  
【整理番号】 103EZ007  
【提出日】 平成15年11月27日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県磐田市中泉 1797 ひかりハイツ 336号  
    【氏名】 町田 和弘  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県磐田市中泉 1797 ひかりハイツ 332号  
    【氏名】 中島 崇  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000000217  
    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001915  
    【氏名又は名称】 メルシャン株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100087642  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 古谷 聡  
    【電話番号】 03(3663)7808  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100076680  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 溝部 孝彦  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100091845  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 持田 信二  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100098408  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 義経 和昌  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 200747  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

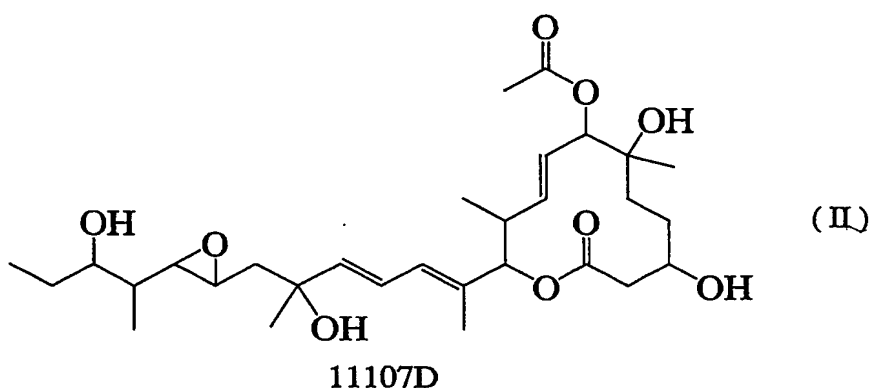
式 (I)

【化 1】



で示されるマクロライド系化合物（以下マクロライド系化合物11107Bという）の、  
式 (II)、

【化 2】



で示される16位水酸化マクロライド系化合物への生物学的変換に関与するDNAであって、  
16位水酸化酵素活性を有するタンパク質またはフェレドキシンを一部にまたは全体として  
コードするDNA、またはその改変体を含んでなる単離された純粋なDNA。

【請求項 2】

下記の(a)、(b)または(c)で示される請求項 1 記載のDNA。

(a) マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコード  
するDNAであって、配列番号 1 の塩基1322から塩基2548までの連続した塩基配列、配列  
番号 2 の塩基420から塩基1604までの連続した塩基配列および配列番号 3 の塩基172から塩  
基1383までの連続した塩基配列からなる群より選択されるDNA。

(b) 前記(a)で示されるDNAの改変体であって、

(i) 前記(a)で示されるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、  
(ii) マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードす  
るDNA。

(c) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(a)に示されるDNAとストリンジェントな条件  
下でハイブリダイズしないが、前記(a)または(b)で示されるDNAによりコードされるタ  
ンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 3】

請求項2記載のDNAによりコードされるタンパク質。

【請求項4】

請求項2記載のDNAを担持する自立複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

【請求項5】

請求項4記載の組み換えプラスミドで形質転換した形質転換体。

【請求項6】

請求項2に記載されたDNAまたはその一部からなるDNAをプローブまたはプライマーとして用いることを特徴とする、マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAの単離方法。

【請求項7】

下記の(d)、(e)または(f)で示される請求項1記載のDNA。

(d) フェレドキシンをコードするDNAであって、配列番号1の塩基2564から塩基2761までの連続した塩基配列、配列番号2の塩基1643から塩基1834までの連続した塩基配列および配列番号3の塩基1399から塩基1593までの連続した塩基配列からなる群より選択されるDNA。

(e) 前記(d)で示されるDNAの改変体であって、

(i) 前記(d)で示されるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、  
(ii) フェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNA。

(f) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(d)に示されるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしないが、前記(d)または(e)で示されるDNAによりコードされるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】

請求項7記載のDNAによりコードされるタンパク質。

【請求項9】

請求項7記載のDNAを担持する自立複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

【請求項10】

請求項9記載の組み換えプラスミドで形質転換した形質転換体。

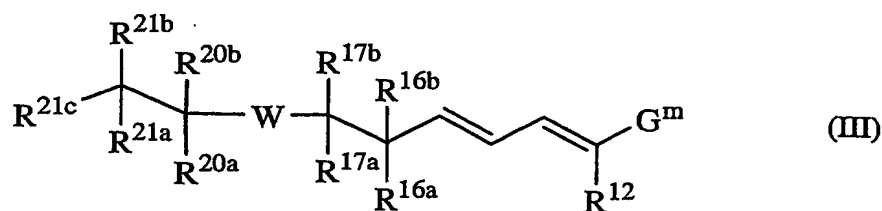
【請求項11】

請求項7に記載されたDNAまたはその一部からなるDNAをプローブまたはプライマーとして用いることを特徴とする、フェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAの単離方法。

【請求項12】

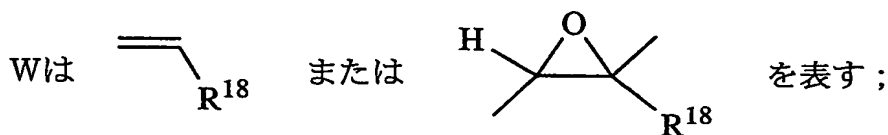
請求項5または請求項10記載の形質転換体を培地で培養し、培養中又は培養後に、増殖した形質転換体と、式(III)

【化3】



〔式中、

## 【化 4】



$R^{12}$ 、 $R^{16b}$ 、 $R^{17a}$ 、 $R^{17b}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{20a}$ 、 $R^{20b}$ 、 $R^{21a}$  および  $R^{21b}$  は同一または異なって、

- (1) 水素原子、
  - (2) 置換基を有していても良い  $C_{1-22}$  アルキル基、
  - (3)  $-OR$  (式中、 $R$  は
    - 1) 水素原子、
    - 置換基を有していても良い、
    - 2)  $C_{1-22}$  アルキル基、
    - 3)  $C_{7-22}$  アラルキル基、
    - 4) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシアルキル基、
    - 5)  $C_{2-22}$  アルカノイル基、
    - 6)  $C_{7-15}$  アロイル基、
    - 7)  $C_{3-23}$  不飽和アルカノイル基、
    - 8)  $-COR^c$  (式中、 $R^c$  は置換基を有していても良い、
      - 8-1) 5員環ないし14員環ヘテロアリール基、
      - 8-2)  $C_{1-22}$  アルコキシ基、
      - 8-3) 不飽和  $C_{2-22}$  アルコキシ基、
      - 8-4)  $C_{6-14}$  アリールオキシ基、
      - 8-5) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基、
    - もしくは
    - 8-6) 3員環ないし14員環の含窒素非芳香族複素環を表す)、
  - 9)  $C_{1-22}$  アルキルスルホニル基、
  - 10)  $C_{6-14}$  アリールスルホニル基
- または

11)  $-SiR^{s1}R^{s2}R^{s3}$  (式中、 $R^{s1}$ 、 $R^{s2}$ 、 $R^{s3}$  は同一または異なって、 $C_{1-6}$  アルキル基または  $C_{6-14}$  アリール基を表す) を表す)、

(4) ハロゲン原子

または

(5)  $-R^M-NR^{N1}R^{N2}$

{式中、 $R^M$  は単結合または  $-O-CO-$  を表す；

$R^{N1}$  および  $R^{N2}$  は

- 1) 同一または異なって、
  - 1-1) 水素原子もしくは
  - 1-2) 置換基を有していても良い、
    - (i)  $C_{1-22}$  アルキル基、
    - (ii) 不飽和  $C_{2-22}$  アルキル基、
    - (iii)  $C_{2-22}$  アルカノイル基
    - (iv)  $C_{7-15}$  アロイル基、
    - (v) 不飽和  $C_{3-23}$  アルカノイル基、
    - (vi)  $C_{6-14}$  アリール基、
    - (vii) 5員環ないし14員環ヘテロアリール基、
    - (viii)  $C_{7-22}$  アラルキル基、
    - (ix)  $C_{1-22}$  アルキルスルホニル基もしくは

(x) C<sub>6-14</sub> アリールスルホニル基を表すか、  
 または  
 2) R<sup>N1</sup> および R<sup>N2</sup> は結合する窒素原子と一緒にあって置換基を有していても良い 3 員環ないし 14 員環の含窒素非芳香族複素環を形成する} を表す；

ただし、

R<sup>21a</sup> および R<sup>21b</sup> は一緒にあって、(i) ケトン構造 (=O) または (ii) オキシム構造 |  
 =NOR<sup>ox</sup> (式中、R<sup>ox</sup> は置換基を有していても良い、C<sub>1-22</sub> アルキル基、不飽和 C<sub>2-22</sub> アルキル基、C<sub>6-14</sub> アリール基、5 員環ないし 14 員環ヘテロアリール基または C<sub>7-22</sub> アラルキル基を表す) } を形成しても良い；

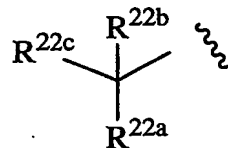
R<sup>16a</sup> は水素原子を表す；

R<sup>21c</sup> は

(1) 水素原子または

(2)

【化 5】



(式中、R<sup>22a</sup>、R<sup>22b</sup> および R<sup>22c</sup> は同一または異なって、

1) 水素原子、

2) C<sub>1-6</sub> アルキル基、

3) -OR (式中、R は前記の意味を有する)、

4) -R<sup>M</sup>-NR<sup>N1</sup>R<sup>N2</sup> (式中、R<sup>M</sup>、R<sup>N1</sup> および R<sup>N2</sup> は前記の意味を有する) または

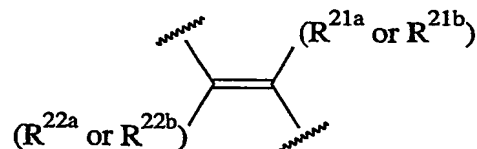
5) ハロゲン原子

を表す；

あるいは、

R<sup>21a</sup> および R<sup>21b</sup> のどちらか一方と R<sup>22a</sup> および R<sup>22b</sup> のどちらか一方とが一緒にあって部分構造

【化 6】

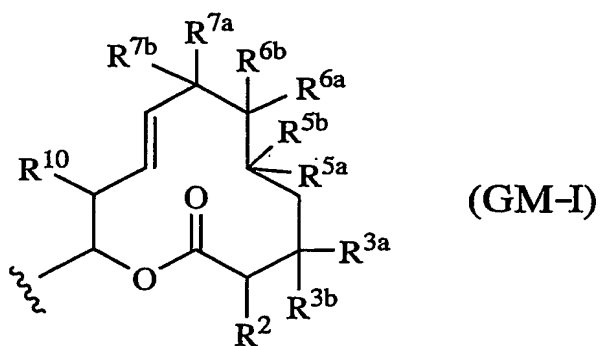


を形成しても良い；

G<sup>m</sup> は

(1) 式 (GM-I) で示される基

## 【化7】



式中、

$R^2$  および  $R^{10}$  は同一または異なって、水素原子または  $C_{1-22}$  アルキル基を表す；  
 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6a}$  および  $R^{6b}$  は同一または異なって、

- 1) 水素原子、
- 2) ヒドロキシ基、
- 3) 置換基を有していても良い、

- 3-1)  $C_{1-22}$  アルキル基、
- 3-2)  $C_{1-22}$  アルコキシ基、
- 3-3)  $C_{6-14}$  アリールオキシ基
- 3-4) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基、
- 3-5)  $C_{2-22}$  アルカノイルオキシ基、
- 3-6)  $C_{7-15}$  アロイルオキシ基
- 3-7)  $C_{3-23}$  不飽和アルカノイルオキシ基、
- 3-8)  $-OCOR^{c0}$  (式中、 $R^{c0}$  は前記の意味を有する)、
- 3-9)  $C_{1-22}$  アルキルスルホニルオキシ基、
- 3-10)  $C_{6-14}$  アリールスルホニルオキシ基

または

- 3-11)  $-OSiR^{s1}R^{s2}R^{s3}$  (式中、 $R^{s1}$ 、 $R^{s2}$  および  $R^{s3}$  は前記の意味を有する)

- 4) ハロゲン原子

または

- 5)  $-R^M-NR^{N1}R^{N2}$  (式中、 $R^M$ 、 $R^{N1}$  および  $R^{N2}$  は前記の意味を有する) を表す；

あるいは、  
 $R^{5a}$  および  $R^{5b}$  は一緒になってケトン構造 ( $=O$ ) を形成しても良い；

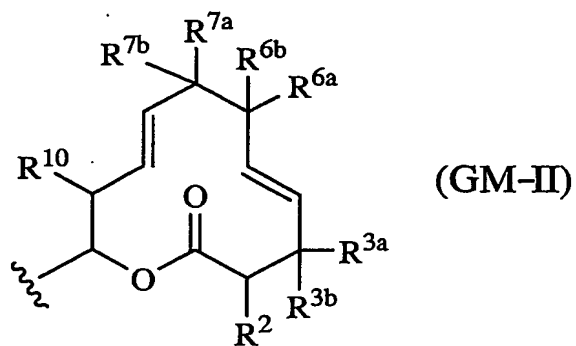
あるいは、

$R^{6a}$  および  $R^{6b}$  は一緒になって、スピロオキシラニル基またはエキソメチレン基を形成しても良い；

$R^{7a}$  および  $R^{7b}$  は同一または異なって、水素原子または  $-OR^H$  (式中、 $R^H$  は水素原子、 $C_{1-22}$  アルキル基または  $C_{2-22}$  アルカノイル基を表す) を表す}

(2) 式 (GM-II) で示される基

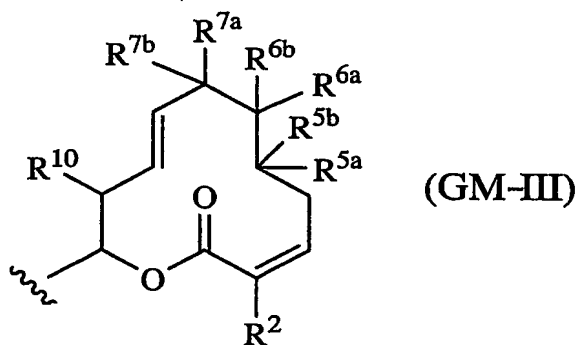
【化 8】



(式中、 $R^2$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である)、

(3) 式 (GM-III) で示される基

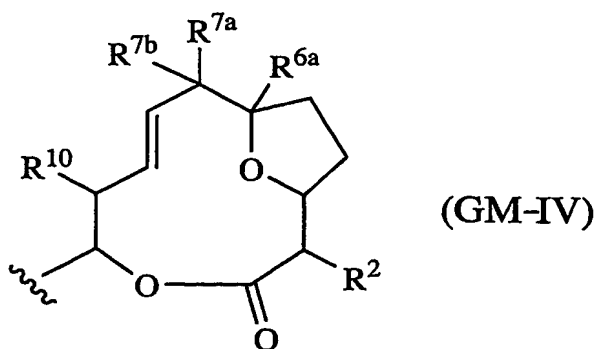
【化 9】



(式中、 $R^2$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である)、

(4) 式 (GM-IV) で示される基

【化 10】

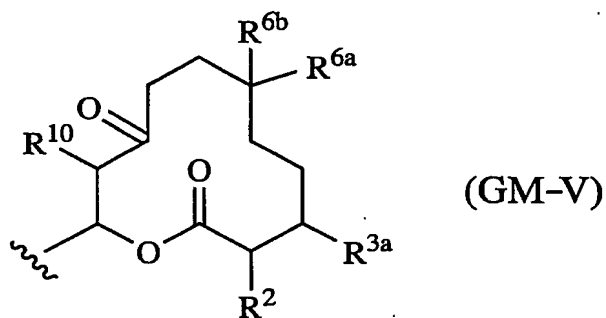


(式中、 $R^2$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である)  
または

(5) 式 (GM-V) で示される基



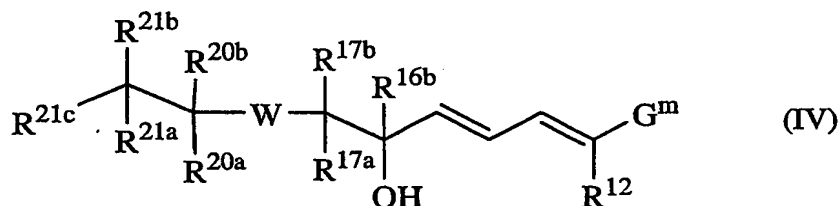
## 【化 1 1】



(式中、 $R^2$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である) を表す。  
]

で示されるマクロライド系化合物とを接触させ、式 (IV)

## 【化 1 2】



(式中、 $W$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{16b}$ 、 $R^{17a}$ 、 $R^{17b}$ 、 $R^{20a}$ 、 $R^{20b}$ 、 $R^{21a}$ 、 $R^{21b}$ 、 $R^{21c}$ および $G^m$ は式 (III) の定義と同義を表す。)

で示される16位水酸化マクロライド系化合物に変換し、こうして変換された16位水酸化マクロライド系化合物を採取することを特徴とする16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法。

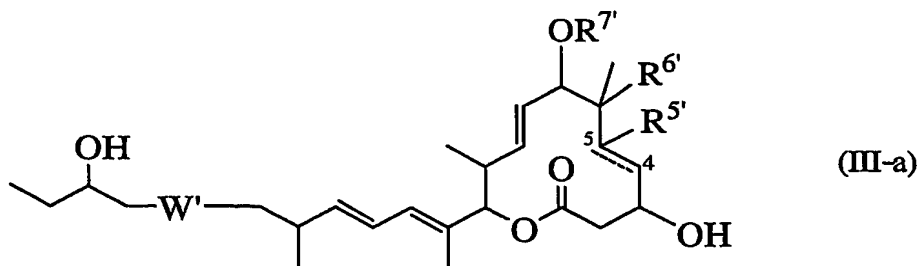
## 【請求項 1 3】

形質転換体が、請求項 5 記載の形質転換体であり、かつフェレドキシンをコードする DNA を有する形質転換体である請求項 1 2 記載の生産方法。

## 【請求項 1 4】


式 (III-a)

## 【化 1 3】



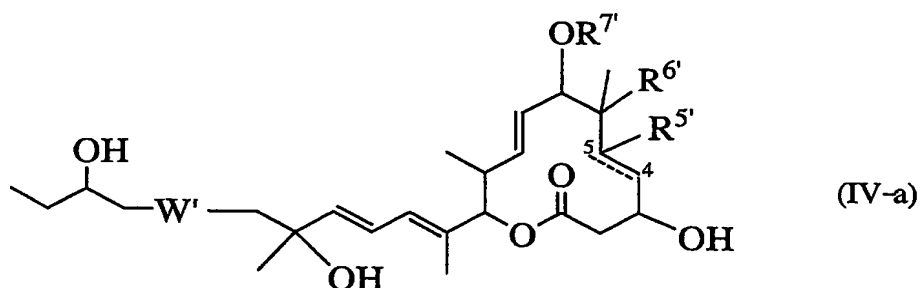
(式中、

【化 1 4】

$5 \equiv 4$  は二重結合または単結合、 $W'$  は二重結合または 、

$R^{5'}$  は水素原子またはアセトキシ基、 $R^{6'}$  は水素原子またはヒドロキシ基、 $R^{7'}$  は水素原子またはアセチル基を表す。) で示される化合物を、式 (IV-a)

【化 1 5】



(式中、

【化 1 6】

$5 \equiv 4$ 、

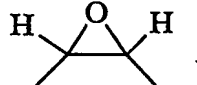
$W'$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$  および  $R^{7'}$  は式 (III-a) の定義と同義である。) で示される化合物に変換することを特徴とする、請求項 12 記載の生産方法。

【請求項 15】

式 (III-a) の化合物の、式 (IV-a) の化合物への変換において、

(1)

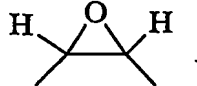
【化 1 7】

$5 \equiv 4$  が単結合、 $W'$  が 、

$R^{5'}$ 、 $R^{6'}$  および  $R^{7'}$  が水素原子である化合物、

(2)

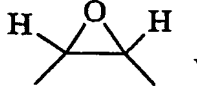
【化 1 8】

$5 \equiv 4$  が単結合、 $W'$  が 、

$R^{5'}$  および  $R^{6'}$  が水素原子、 $R^{7'}$  がアセチル基である化合物、

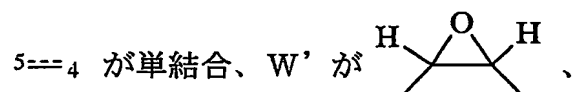
(3)

【化 1 9】

$5 \equiv 4$  が単結合、 $W'$  が 、

R<sup>5'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基である化合物、  
(4)

【化 2 0】



R<sup>5'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、  
(5)

【化 2 1】

$5 \equiv 4$  が単結合、

W' が二重結合、R<sup>5'</sup>、R<sup>6'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子である化合物、  
(6)

【化 2 2】

$5 \equiv 4$  が単結合、

W' が二重結合、R<sup>5'</sup> および R<sup>6'</sup> が水素原子、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、  
(7)

【化 2 3】

$5 \equiv 4$  が単結合、

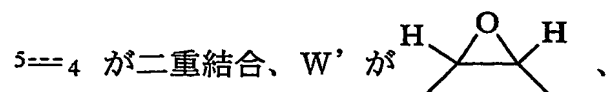
W' が二重結合、R<sup>5'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基である化合物、  
(8)

【化 2 4】

$5 \equiv 4$  が単結合、

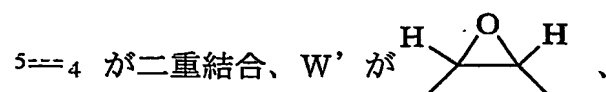
W' が二重結合、R<sup>5'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、  
(9)

【化 2 5】



R<sup>5'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基である化合物、  
(10)

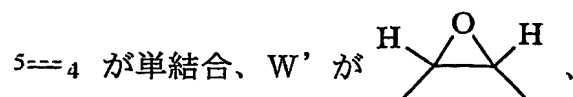
【化 2 6】



R<sup>5'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、

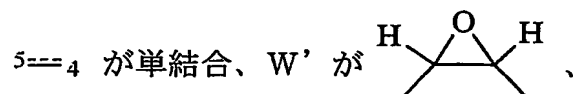
(11)

【化 27】



$R^{5'}$  がアセトキシ基、 $R^{6'}$  がヒドロキシ基、 $R^{7'}$  が水素原子である化合物および  
(12)

【化 28】



$R^{5'}$  がアセトキシ基、 $R^{6'}$  がヒドロキシ基、 $R^{7'}$  がアセチル基である化合物  
からなる群から選択される化合物を対象とする請求項 14 記載の生産方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マクロライド系化合物の水酸化に関するDNA

【技術分野】

【0001】

本発明はマクロライド系化合物の水酸化に関するDNA、その単離方法、そのDNAによりコードされるタンパク質、そのDNAを担持するプラスミド、そのプラスミドで形質転換した形質転換体、その形質転換体を用いた16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法に関する。

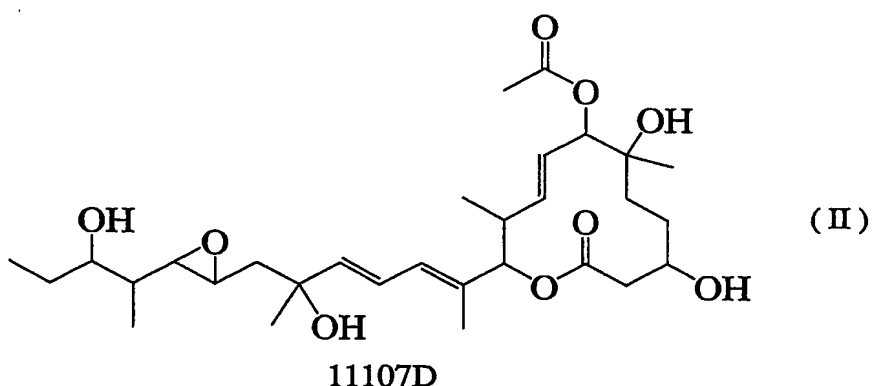
【背景技術】

【0002】

式(II)

【0003】

【化29】

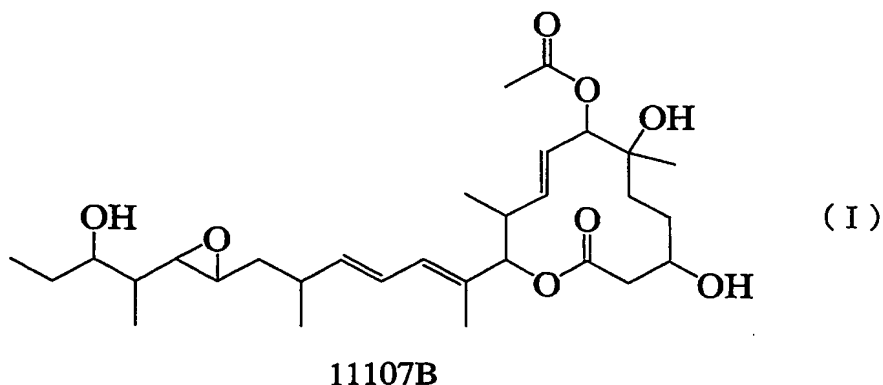


【0004】

で表される12員環マクロライド系化合物11107Dは、優れた抗腫瘍活性を有する12員環マクロライド系化合物であり、式 (I)

【0005】

【化30】



【0006】

で表される12員環マクロライド系化合物11107Bとともにストレプトミセス エスピー (Streptomyces sp.) Mer-11107株の培養物より見出されている(特許文献1参照)。マクロライド系化合物11107Dは、マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化体に相当するが、その生産性はマクロライド系化合物11107Bの生産性よりも少なく、効率的な製造方法の確立が望まれていた。

【特許文献1】国際公開第02/060890号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、マクロライド系化合物11107Bの水酸化に關与するDNAを見出し、マクロライド系化合物11107Dの新規な生産方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

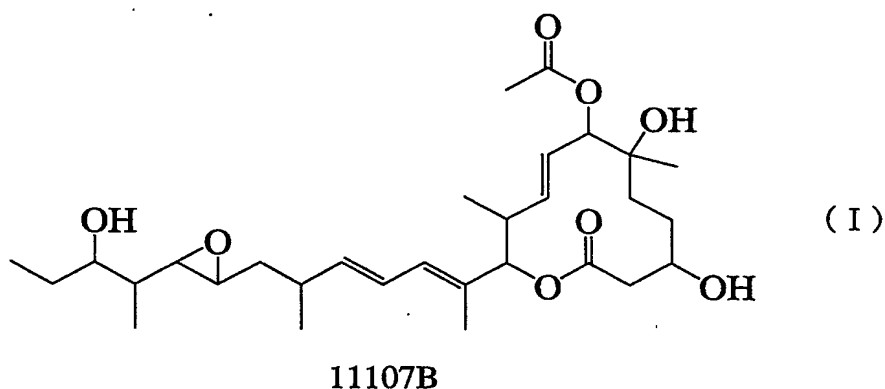
本発明は、以下の〔1〕～〔15〕に関する。

【0009】

〔1〕：式（I）

【0010】

【化31】

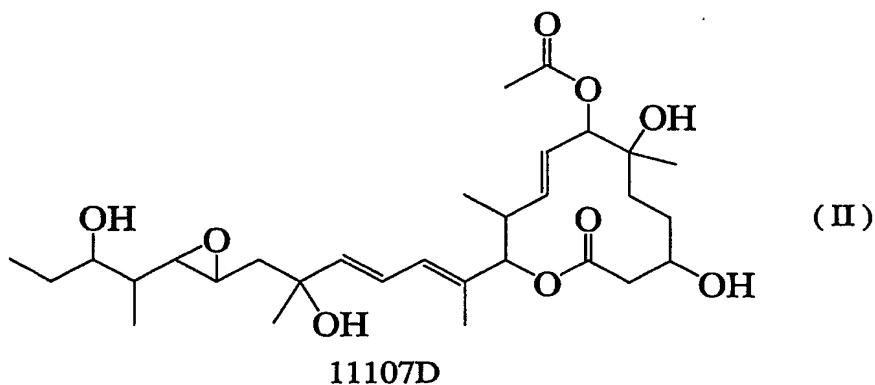


【0011】

で示されるマクロライド系化合物（以下マクロライド系化合物11107Bという）の、式（II）、

【0012】

【化32】



【0013】

で示される16位水酸化マクロライド系化合物（以下マクロライド系化合物11107Dという）への生物学的変換に關与するDNAであって、16位水酸化酵素活性を有するタンパク質またはフェレドキシンを一部にまたは全体としてコードするDNA、またはその改変体を含んでなる単離された純粋なDNA。

【0014】

[2]: 下記の(a)、(b)または(c)で示される [1] 記載の DNA。

【0015】

(a) マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA であって、配列番号 1 の塩基1322から塩基2548までの連続した塩基配列、配列番号 2 の塩基420から塩基1604までの連続した塩基配列および配列番号 3 の塩基172から塩基1383までの連続した塩基配列からなる群より選択される DNA。

【0016】

(b) 前記(a)で示される DNA の改変体であって、

- (i) 前記(a)で示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、
- (ii) マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0017】

(c) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(a)に示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズしないが、前記(a)または(b)で示される DNA によりコードされるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA。

【0018】

[3]: [2] 記載の DNA によりコードされるタンパク質。

【0019】

[4]: [2] の DNA を担持する自立複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

【0020】

[5]: [4] の組み換えプラスミドで形質転換した形質転換体。

【0021】

[6]: [2] に記載された DNA またはその一部からなる DNA をプローブまたはプライマーとして用いることを特徴とする、マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA の単離方法。

【0022】

[7]: 下記の(d)、(e)または(f)で示される [1] 記載の DNA。

【0023】

(d) フェレドキシンをコードする DNA であって、配列番号 1 の塩基2564から塩基2761までの連続した塩基配列、配列番号 2 の塩基1643から塩基1834までの連続した塩基配列および配列番号 3 の塩基1399から塩基1593までの連続した塩基配列からなる群より選択される DNA。

【0024】

(e) 前記(d)で示される DNA の改変体であって、

- (i) 前記(d)で示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、
- (ii) フェレドキシン機能を有するタンパク質をコードする DNA。

【0025】

(f) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(d)に示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズしないが、前記(d)または(e)で示される DNA によりコードされるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA。

【0026】

[8]: [7] 記載の DNA によりコードされるタンパク質。

【0027】

[9]: [7] 記載の DNA を担持する自立複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

【0028】

[10]: [9] 記載の組み換えプラスミドで形質転換した形質転換体。

【0029】

[11]: [7] に記載された DNA またはその一部からなる DNA をプローブまたは

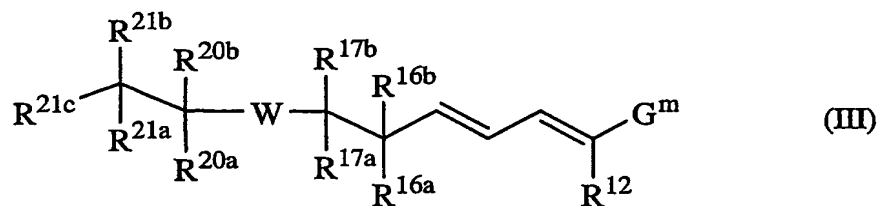
プライマーとして用いることを特徴とする、フェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAの単離方法。

【0030】

【12】: 【5】または【10】記載の形質転換体を培地で培養し、培養中又は培養後に、増殖した形質転換体と、式 (III)

【0031】

【化33】

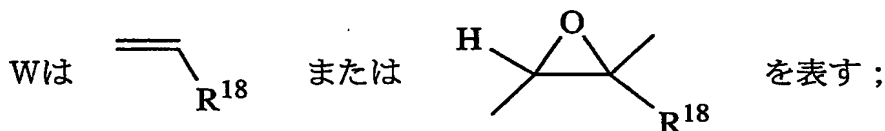


【0032】

〔式中、

【0033】

【化34】



【0034】

$R^{12}$ 、 $R^{16b}$ 、 $R^{17a}$ 、 $R^{17b}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{20a}$ 、 $R^{20b}$ 、 $R^{21a}$ および $R^{21b}$ は同一または異なって、

- (1) 水素原子、
- (2) 置換基を有していても良い $C_{1-22}$ アルキル基、
- (3)  $-OR$  (式中、 $R$ は
  - 1) 水素原子、
  - 置換基を有していても良い、
  - 2)  $C_{1-22}$ アルキル基、
  - 3)  $C_{7-22}$ アラルキル基、
  - 4) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシアルキル基、
  - 5)  $C_{2-22}$ アルカノイル基、
  - 6)  $C_{7-15}$ アロイル基、
  - 7)  $C_{3-23}$ 不飽和アルカノイル基、
  - 8)  $-COR^o$  (式中、 $R^o$ は置換基を有していても良い、
    - 8-1) 5員環ないし14員環ヘテロアリール基、
    - 8-2)  $C_{1-22}$ アルコキシ基、
    - 8-3) 不飽和 $C_{2-22}$ アルコキシ基、
    - 8-4)  $C_{6-14}$ アリールオキシ基、
    - 8-5) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基、
  - もしくは
  - 8-6) 3員環ないし14員環の含窒素非芳香族複素環を表す)、
  - 9)  $C_{1-22}$ アルキルスルホニル基、
  - 10)  $C_{6-14}$ アリールスルホニル基

または



11)  $-SiR^{s1}R^{s2}R^{s3}$  (式中、 $R^{s1}$ 、 $R^{s2}$ 、 $R^{s3}$ は同一または異なって、 $C_{1-6}$ アルキル基または $C_{6-14}$ アリール基を表す)を表す)、

(4) ハロゲン原子

または

(5)  $-R^M-NR^{N1}R^{N2}$

式中、 $R^M$ は単結合または $-O-CO-$ を表す；

$R^{N1}$ および $R^{N2}$ は

1) 同一または異なって、

1-1) 水素原子もしくは

1-2) 置換基を有していても良い、

(i)  $C_{1-22}$ アルキル基、

(ii) 不飽和 $C_{2-22}$ アルキル基、

(iii)  $C_{2-22}$ アルカノイル基

(iv)  $C_{7-15}$ アロイル基、

(v) 不飽和 $C_{3-23}$ アルカノイル基、

(vi)  $C_{6-14}$ アリール基、

(vii) 5員環ないし14員環ヘテロアリール基、

(viii)  $C_{7-22}$ アラルキル基、

(ix)  $C_{1-22}$ アルキルスルホニル基もしくは

(x)  $C_{6-14}$ アリールスルホニル基を表すか、

または

2)  $R^{N1}$ および $R^{N2}$ は結合する窒素原子と一緒にあって置換基を有していても良い3員環ないし14員環の含窒素非芳香族複素環を形成する}を表す；

ただし、

$R^{21a}$ および $R^{21b}$ は一緒にあって、(i)ケトン構造( $=O$ )または(ii)オキシム構造 $\{=NOR^{ox}$  (式中、 $R^{ox}$ は置換基を有していても良い、 $C_{1-22}$ アルキル基、不飽和 $C_{2-22}$ アルキル基、 $C_{6-14}$ アリール基、5員環ないし14員環ヘテロアリール基または $C_{7-22}$ アラルキル基を表す)}を形成しても良い；

$R^{16a}$ は水素原子を表す；

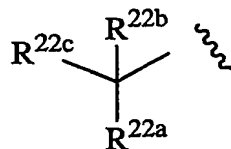
$R^{21c}$ は

(1) 水素原子または

(2)

【0035】

【化35】



【0036】

(式中、 $R^{22a}$ 、 $R^{22b}$ および $R^{22c}$ は同一または異なって、

1) 水素原子、

2)  $C_{1-6}$ アルキル基、

3)  $-OR$  (式中、 $R$ は前記の意味を有する)、

4)  $-R^M-NR^{N1}R^{N2}$  (式中、 $R^M$ 、 $R^{N1}$ および $R^{N2}$ は前記の意味を有する) または

5) ハロゲン原子

を表す；

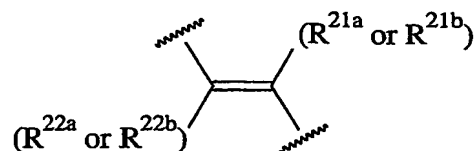
あるいは、

$R^{21a}$ および $R^{21b}$ のどちらか一方と $R^{22a}$ および $R^{22b}$ のどちらか一方とが一緒にあって

部分構造

【0037】

【化36】



【0038】

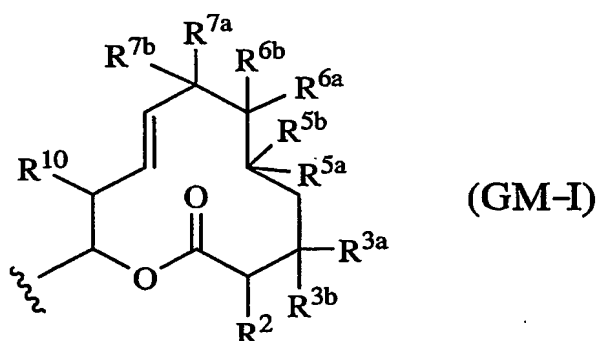
を形成しても良い;

G<sup>m</sup>は

(1) 式 (GM-I) で示される基

【0039】

【化37】



【0040】

式中、

R<sup>2</sup>およびR<sup>10</sup>は同一または異なって、水素原子またはC<sub>1-22</sub>アルキル基を表す;R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、R<sup>5a</sup>、R<sup>5b</sup>、R<sup>6a</sup>およびR<sup>6b</sup>は同一または異なって、

1) 水素原子、

2) ヒドロキシ基、

3) 置換基を有していても良い、

3-1) C<sub>1-22</sub>アルキル基、3-2) C<sub>1-22</sub>アルコキシ基、3-3) C<sub>6-14</sub>アリールオキシ基

3-4) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基、

3-5) C<sub>2-22</sub>アルカノイルオキシ基、3-6) C<sub>7-15</sub>アロイルオキシ基3-7) C<sub>3-23</sub>不飽和アルカノイルオキシ基、3-8) -OCOR<sup>co</sup> (式中、R<sup>co</sup>は前記の意味を有する)、3-9) C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニルオキシ基、3-10) C<sub>6-14</sub>アリールスルホニルオキシ基

または

3-11) -OSiR<sup>s1</sup>R<sup>s2</sup>R<sup>s3</sup> (式中、R<sup>s1</sup>、R<sup>s2</sup>およびR<sup>s3</sup>は前記の意味を有する)

4) ハロゲン原子

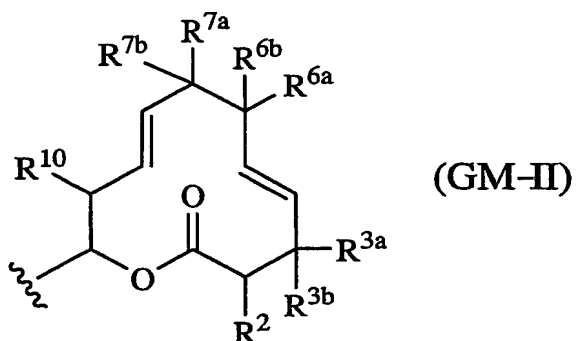
または

- 5)  $-R^M-NR^{N1}R^{N2}$  (式中、 $R^M$ 、 $R^{N1}$  および  $R^{N2}$  は前記の意味を有する) を表す;  
 あるいは、  
 $R^{5a}$  および  $R^{5b}$  は一緒になってケトン構造 ( $=O$ ) を形成しても良い;  
 あるいは、  
 $R^{6a}$  および  $R^{6b}$  は一緒になって、スピロオキシラニル基またはエキソメチレン基を形成しても良い;  
 $R^{7a}$  および  $R^{7b}$  は同一または異なって、水素原子または  $-OR^H$  (式中、 $R^H$  は水素原子、 $C_{1-22}$  アルキル基または  $C_{2-22}$  アルカノイル基を表す) を表す}

(2) 式 (GM-II) で示される基

【0041】

【化38】



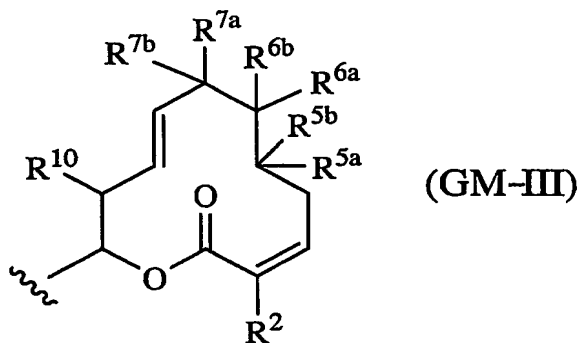
【0042】

(式中、 $R^2$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$  および  $R^{10}$  は式 (GM-I) の定義と同義である)、

(3) 式 (GM-III) で示される基

【0043】

【化39】



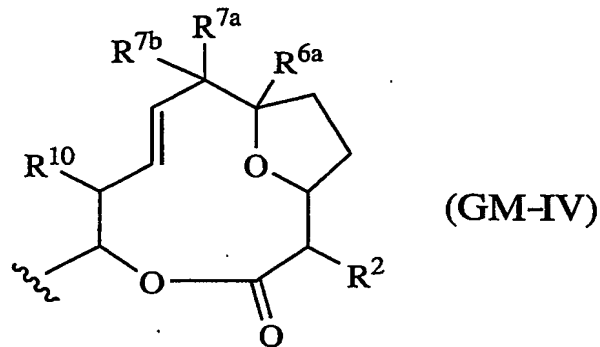
【0044】

(式中、 $R^2$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$  および  $R^{10}$  は式 (GM-I) の定義と同義である)、

(4) 式 (GM-IV) で示される基

【0045】

【化 40】



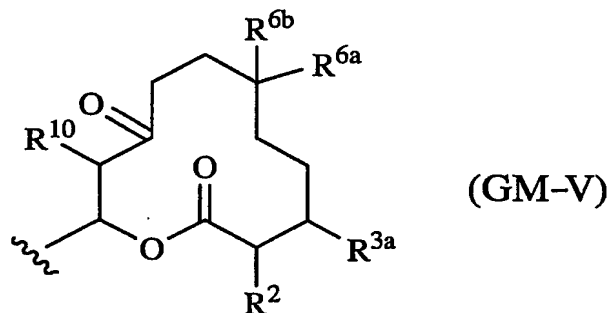
【0046】

(式中、 $R^2$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である)  
または

(5) 式 (GM-V) で示される基

【0047】

【化 41】



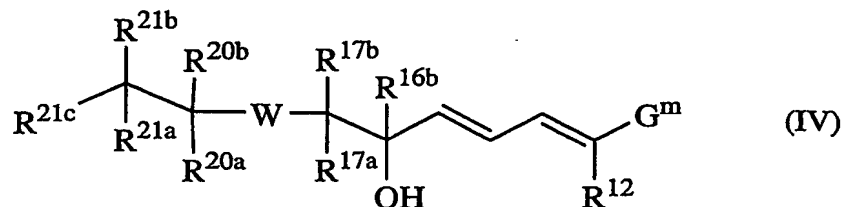
【0048】

(式中、 $R^2$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{6b}$ および $R^{10}$ は式 (GM-I) の定義と同義である) を表す。  
]

で示されるマクロライド系化合物とを接触させ、式 (IV)

【0049】

【化 42】



【0050】

(式中、 $W$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{16b}$ 、 $R^{17a}$ 、 $R^{17b}$ 、 $R^{20a}$ 、 $R^{20b}$ 、 $R^{21a}$ 、 $R^{21b}$ 、 $R^{21c}$ および $G^m$ は式 (III) の定義と同義を表す。)

で示される16位水酸化マクロライド系化合物に変換し、こうして変換された16位水酸化マクロライド系化合物を採取することを特徴とする16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法。

【0051】

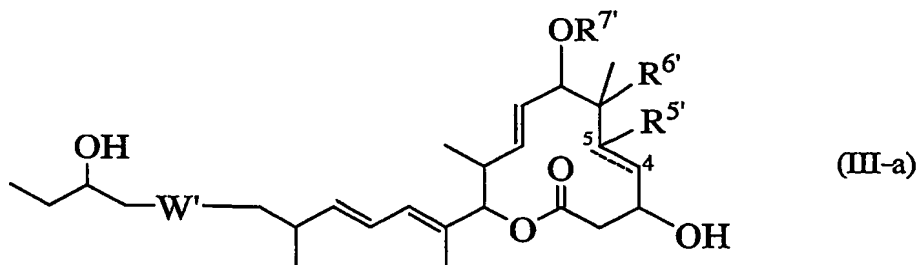
【13】：形質転換体が、【5】記載の形質転換体であり、かつフェレドキシンをコードするDNAを有する形質転換体である【12】記載の生産方法。

【0052】

【14】：式(III-a)

【0053】

【化43】



【0054】

(式中、

【0055】

【化44】

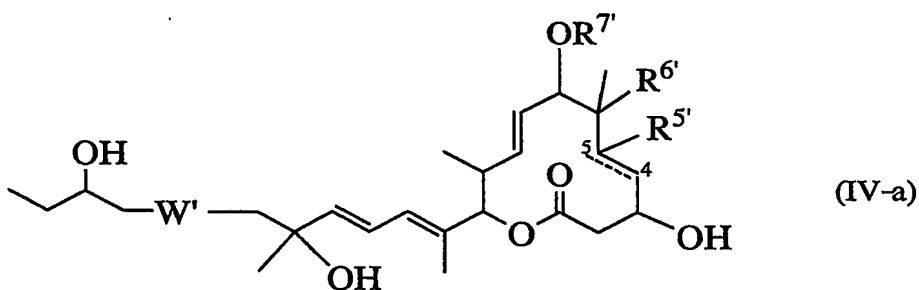
5=4 は二重結合または単結合、W' は二重結合または 、

【0056】

R<sup>5'</sup> は水素原子またはアセトキシ基、R<sup>6'</sup> は水素原子またはヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> は水素原子またはアセチル基を表す。) で示される化合物を、式(IV-a)

【0057】

【化45】



【0058】

(式中、

【0059】

【化46】

5=4 、

【0060】

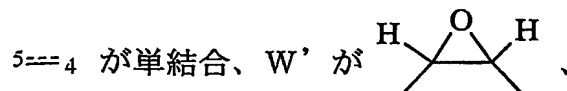
W'、R<sup>5'</sup>、R<sup>6'</sup> および R<sup>7'</sup> は式 (III-a) の定義と同義である。) で示される化合物に変換することを特徴とする、【12】記載の生産方法。

【0061】

[15]: 式(III-a)の化合物の、式(IV-a)の化合物への変換において、  
(1)

【0062】

【化47】



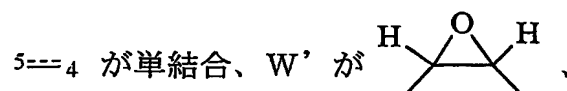
【0063】

$R^{5'}$ 、 $R^{6'}$  および  $R^{7'}$  が水素原子である化合物、

(2)

【0064】

【化48】



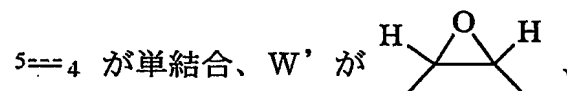
【0065】

$R^{5'}$  および  $R^{6'}$  が水素原子、 $R^{7'}$  がアセチル基である化合物、

(3)

【0066】

【化49】



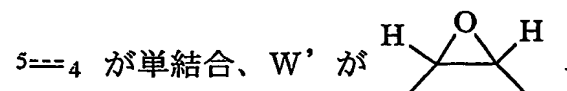
【0067】

$R^{5'}$  および  $R^{7'}$  が水素原子、 $R^{6'}$  がヒドロキシ基である化合物、

(4)

【0068】

【化50】



【0069】

$R^{5'}$  が水素原子、 $R^{6'}$  がヒドロキシ基、 $R^{7'}$  がアセチル基である化合物、

(5)

【0070】

【化51】

$5 \equiv 4$  が単結合、

【0071】

$W'$  が二重結合、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$  および  $R^{7'}$  が水素原子である化合物、

(6)

【0072】

【化52】

 $5 \equiv 4$  が単結合、

【0073】

W' が二重結合、R<sup>5'</sup> および R<sup>6'</sup> が水素原子、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、

(7)

【0074】

【化53】

 $5 \equiv 4$  が単結合、

【0075】

W' が二重結合、R<sup>5'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基である化合物、

(8)

【0076】

【化54】

 $5 \equiv 4$  が単結合、

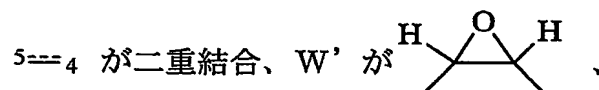
【0077】

W' が二重結合、R<sup>5'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、

(9)

【0078】

【化55】



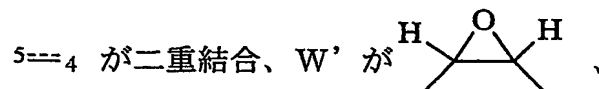
【0079】

R<sup>5'</sup> および R<sup>7'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基である化合物、

(10)

【0080】

【化56】



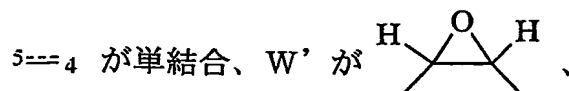
【0081】

R<sup>5'</sup> が水素原子、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物、

(11)

【0082】

【化57】

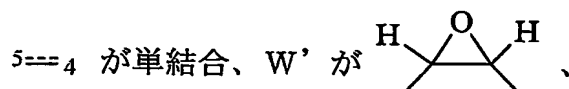


【0083】

R<sup>5'</sup> がアセトキシ基、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> が水素原子である化合物および  
(12)

【0084】

【化58】



【0085】

R<sup>5'</sup> がアセトキシ基、R<sup>6'</sup> がヒドロキシ基、R<sup>7'</sup> がアセチル基である化合物  
からなる群から選択される化合物を対象とする [14] 記載の生産方法。

【発明の効果】

【0086】

本発明により、マクロライド系化合物11107Bの16位水酸化酵素活性を有するタンパク質  
またはフェレドキシンをコードするDNAを単離して、その塩基配列を決定することがで  
き、更に、そのDNAを担持するプラスミド、そのプラスミドで形質転換した形質転換体  
を作成し、その形質転換体を用いて、16位水酸化マクロライド系化合物を効率よく生産  
することができた。

【発明を実施するための最良の形態】

【0087】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

【0088】

マクロライド系化合物11107Bからマクロライド系化合物11107Dへ変換する能力を有する  
微生物

本発明においては、マクロライド系化合物11107Bからマクロライド系化合物11107Dへ変  
換する能力を有する微生物を培養した培養液から集めた菌体から、16位水酸化酵素活性を  
有するタンパク質またはフェレドキシンを一部にまたは全体としてコードするDNAを単  
離し、塩基配列を決定することができる。そして、このDNAを担持する自立複製性また  
は組み込み複製性の組み換えプラスミドを構築し、そのプラスミドを用いて形質転換体を  
調製する。

【0089】

このようにして調製した形質転換体を培地で培養し、培養中又は培養後に、増殖した形  
質転換体と、前記式 (III) で表されるマクロライド系化合物を接触させることにより、  
式 (IV) で表される16位水酸化マクロライド系化合物に変換し、変換された16位水酸化マク  
ロライド系化合物を採取することにより、16位水酸化マクロライド系化合物を得ることが  
できる。

【0090】

マクロライド系化合物11107Bからマクロライド系化合物11107Dへ変換する能力を有する  
微生物としては、このような能力を有するものであれば、種および株の種類を問うことな  
く使用できるが、好ましい微生物として、いずれも土壌から分離されたストレプトミセス  
エスピー (Streptomyces sp.) Mer-11107、A-1544株や、未同定の放線菌A-1560株を挙げ  
ることができる。



## 【0091】

尚、Streptomyces sp. Mer-11107はFERM BP-7812として、また、Streptomyces sp. A-1544はFERM BP-8446として、A-1560株はFERM P-19585として、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (IPOD) に寄託した。

## 【0092】

上記菌株の菌学的性状は次のとおりである。

## 【0093】

[Mer-11107株の菌学的性状]

## (1) 形態

基生菌糸より螺旋状 (Spirales) の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に10~20個程度の円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子の大きさは $0.7 \times 1.0 \mu\text{m}$ 位で、孢子の表面は平滑 (smooth) を示し、孢子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

## 【0094】

## (2) 各種培地における生育状態

各種培地上で28℃、2週間培養後の培養性状を以下に示す。色調の記載はトレズナーのカラー・ホイールズ (TresnerのColor wheels)の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

## 【0095】

## 1) イースト・麦芽寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色の孢子 (Light gray ; d)が見られる。培養裏面はLight melon yellow (3ea)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0096】

## 2) オートミール寒天培地

生育は中程度で、その表面に気中菌糸を僅かに着生し、灰色の孢子 (Gray ; g)が見られる。培養裏面はNude tan (4gc)またはPutty (1 1/2 ec)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0097】

## 3) スターチ・無機塩寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色の孢子 (Gray ; e)が見られる。培養裏面はFawn (4ig)またはGray (g)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0098】

## 4) グリセリン・アスパラギン寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、白色の孢子 (White ; a)が見られる。培養裏面はPearl pink (3ca)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0099】

## 5) ペプトン・イースト・鉄寒天培地

生育は悪く、その表面に気中菌糸を着生しない。培養裏面はLight melon yellow (3ea)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0100】

## 6) チロシン寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、白色の孢子 (White ; a)が見られる。培養裏面はPearl pink (3ca)である。溶解性色素は産生しない。

## 【0101】

## (3) 各種炭素源の同化性

ブリードハム・ゴトリープ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を以下に示す。

## 【0102】

## 1) L-アラビノース 土

- |             |   |
|-------------|---|
| 2) D-キシロース  | ± |
| 3) D-グルコース  | + |
| 4) D-フルクトース | + |
| 5) シュークロース  | + |
| 6) イノシトール   | + |
| 7) L-ラムノース  | - |
| 8) D-マンニトール | + |
| 9) ラフィノース   | + |

(+は同化する、±は多少同化する、-は殆ど同化しない。)

#### (4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- (a) 生育温度範囲 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 12℃～37℃
- (b) 最適温度範囲 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 21℃～33℃
- (c) ゼラチンの液化 (グルコース・ペプトン・ゼラチン培地) : 陰性
- (d) ミルクの凝固 (スキムミルク培地) : 陰性
- (e) ミルクのペプトン化 (スキムミルク培地) : 陰性
- (f) スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天培地) : 陽性
- (g) メラニン様色素の産生 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地) : 陰性  
(チロシン培地) : 陰性
- (h) 硫化水素の産生 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地) : 陰性
- (i) 硝酸塩の還元 (0.1%硝酸カリ含有ブロス) : 陰性
- (j) 食塩の耐性 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 食塩含有量4%以下で生育

#### (5) 菌体成分

本菌の細胞壁からLL-ジアミノピメリン酸及びグリシンが検出された。

#### 【0103】

[A-1544株の菌学的性状]

##### (1) 形態

基生菌糸より螺旋状(Spira type)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に10～20個程度の円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子の大きさは $1.0 \times 1.2 \sim 1.4 \mu\text{m}$ 位で、孢子の表面はトゲ状(spiny)を示し、孢子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

#### 【0104】

##### (2) 各種培地における生育状態

各種培地上で28℃、約2週間培養後の培養性状を表1に示す。色調の記載はトレズナーのカラー・ホイールズ(TresnerのColor wheels)の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

#### 【0105】

【表 1】

培 地	生育	気菌糸	基生菌糸の色	可溶性色素
イースト・麦芽寒天培地 (ISP-2)	良好	厚く Silver gray (3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
オートミール寒天培地 (ISP-3)	良好	豊富 Light gray ~Silver gray (d~3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-4)	良好	豊富 Silver gray (3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-5)	良好	豊富 Ashes (5fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP-6)	良好	なし	Light melon yellow (3ea)	薄い 黒褐色
チロシン寒天培地 (ISP-7)	良好	豊富 Covert gray (2fe)	Light melon yellow (3ea)	なし

## 【0106】

## (3) 各種炭素源の同化性

ブリードハム・ゴトリーブ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を表2に示す。

## 【0107】

【表 2】

D-グルコース	+	イノシトール	-
L-アラビノース	+	L-ラムノース	+
D-キシロース	+	D-マンニトール	+
D-フルクトース	+	ラフィノース	-
シュクロース	-		

+: 同化する、±: 多少同化する、-: 殆ど同化しない

## 【0108】

## (4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- (a) 生育温度範囲(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 15℃~41℃
- (b) 生育至適温度(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 20℃~37℃
- (c) ゼラチンの液化(グルコース・ペプトン・ゼラチン培地): 陽性
- (d) ミルクの凝固(スキムミルク培地): 陽性

- (e) ミルクのペプトン化(スキムミルク培地): 陽性
  - (f) スターチの加水分解(スターチ・無機塩寒天培地): 陽性
  - (g) メラニン様色素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陽性  
(チロシン培地): 陰性
  - (h) 硫化水素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陽性
  - (i) 硝酸塩の還元(0.1%硝酸カリ含有ブロス): 陰性
  - (j) 食塩の耐性(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 食塩含有量7%以下で生育
- (5) 菌体成分  
本菌の細胞壁からLL型のジアミノピメリン酸が検出された。

**【0109】****本発明のDNA**

本発明者らは、上記微生物からマクロライド系化合物の16位水酸化に關与するDNA、すなわち16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAおよびフェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離し、その塩基配列を決定した。以下、16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAおよびフェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAを総称して、「16位水酸化酵素関連DNA」ということもある。

**【0110】**

本発明の16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAは、下記(1-1)、(1-2)または(1-3)で示されるものである。

**【0111】**

(1-1) 配列番号1の塩基1322から塩基2548までの連続した塩基配列、配列番号2の塩基420から塩基1604までの連続した塩基配列および配列番号3の塩基172から塩基1383までの連続した塩基配列からなる群より選択されるDNA。

**【0112】**

- (1-2) 前記(1-1)で示されるDNAの改変体であって、
- (i) 前記(1-1)で示されるいずれかのDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、
  - (ii) マクロライド系化合物の16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

**【0113】**

(1-3) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(1-1)に示されるいずれのDNAともストリンジントな条件下でハイブリダイズしないが、前記(1-1)または(1-2)で示されるDNAによりコードされるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

**【0114】**

なお、「16位水酸化酵素活性」とは、前記式(I)で示されるマクロライド系化合物11107Bの16位を水酸化し、前記式(II)で示されるマクロライド系化合物11107Dへ変換する酵素活性を意味する。

**【0115】**

また本発明のフェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAは、下記(2-1)、(2-2)または(2-3)で示されるものである。

**【0116】**

(2-1) フェレドキシンをコードするDNAであって、配列番号1の塩基2564から塩基2761までの連続した塩基配列、配列番号2の塩基1643から塩基1834までの連続した塩基配列および配列番号3の塩基1399から塩基1593までの連続した塩基配列からなる群より選択されるDNA。

**【0117】**

- (2-2) 前記(2-1)で示されるDNAの改変体であって、
- (i) 前記(2-1)で示されるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、
  - (ii) フェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNA。

**【0118】**

(2-3) 遺伝子コドンの縮重のため、前記(2-1)に示されるDNAとストリンジントな条

件下でハイブリダイズしないが、前記(2-1)または(2-2)で示されるDNAによりコードされるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

【0119】

なお、「フェレドキシン機能」とは、前記16位水酸化酵素へ電子を伝達し、前記16位水酸化酵素とともに水酸化反応を担うタンパク質機能を意味する。

【0120】

また前記DNAの説明における「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、前記(1-1)または(2-1)のいずれかのDNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはプラーク由来のDNA又は該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2×SSC溶液(1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989 (以下、モレキュラークローニング第2版と略す)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0121】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられ、例えば85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは93%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAが挙げられる。

【0122】

本発明の16位水酸化酵素関連DNAの取得方法は特に限定されない。本明細書中の配列表の配列番号1、配列番号2または配列番号3に記載した塩基配列の情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いて放線菌に属する微生物のDNAライブラリーをスクリーニングすることにより本発明のDNAを単離することができる。DNAライブラリーは、前記の16位水酸化酵素活性を発現している微生物から常法により作製することができる。

【0123】

またPCR法により本発明の16位水酸化酵素関連DNAを取得することもできる。上記した微生物由来のDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号1、配列番号2または配列番号3に記載したいずれかの塩基配列を増幅できるように設計した1対のプライマーを用いてPCRを行う。PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、94℃で30秒間(変性)、55℃で30秒~1分間(アニーリング)、72℃で2分間(伸長)からなる反応工程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができる。次いで、増幅されたDNA断片を、適当な宿主中で増幅可能なベクター中にクローニングすることができる。

【0124】

上記したプローブ又はプライマーの調製、DNAライブラリーの構築、DNAライブラリーのスクリーニング、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。

【0125】

本発明のタンパク質の取得方法は特に制限されず、化学合成により合成したタンパク質でもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換えタンパク質でもよい。組み換えタンパク質を作製する場合には、先ず、本明細書の上記に記載した当該タンパク質をコードするDNAを取得する。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明のタンパク質を産生することができる。発現系でのタンパク質の発現については本明細書中後記する

## 【0126】

本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよいが、発現ベクターが好ましい。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

## 【0127】

本発明の形質転換体及びそれを用いた組み換えタンパク質の製造

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。本発明のDNAまたは組み換えベクターが導入される宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。例えば、エレクトロポレーション法は以下のように行うことができる。外来遺伝子が挿入されたプラスミドをコンピテント細胞の懸濁液に加え、この懸濁液をエレクトロポレーション法専用のキューベットに入れ、そのキューベットに高電圧の電気パルスをかける。その後選択培地で培養し、平板寒天培地上で形質転換体を単離する。

## 【0128】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはサッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

## 【0129】

上記の形質転換体は、導入された遺伝子の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

## 【0130】

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、SP-Sepharose FF(アマシャムバイオサイエンス社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

## 【0131】

16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法

本発明は、16位水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA またはフェレドキシン機能を有するタンパク質をコードするDNAを導入した形質転換体を用い、この形質転換体の存在下で前記式(III)で表されるマクロライド系化合物を水酸化させることを含む、前記式(IV)で表される16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法を包含する。

#### 【0132】

本発明の形質転換体で水酸化できるマクロライド系化合物は、前記式(III)で表されるマクロライド系化合物(前記式(IV)で表されるマクロライド系化合物)であり、好ましくは、前記式(III-a)で表されるマクロライド系化合物(前記式(IV-a)で表されるマクロライド系化合物)であり、さらに好ましくはマクロライド系化合物11107B(マクロライド系化合物11107D)である。なお、括弧内は水酸化生成物である16位水酸化マクロライド系化合物である。

#### 【0133】

形質転換体の存在下でマクロライド系化合物を水酸化させる条件は、以下の通りである。

#### 【0134】

まず形質転換体中の16位水酸化酵素関連DNAを必要により誘導物質を添加し菌体内で発現させる。これらのDNAが発現した菌体を基質である前記式(III)で表されるマクロライド系化合物と接触させ、変換反応をさせる。変換反応の温度は、形質転換体の至適温度を考慮して、適宜決定できる。また反応時間も、16位水酸化マクロライド系化合物への変換率(反応の進行度合い)等を考慮して、適宜決定することができる。例えば、20~31℃で、1~5日が好適である。さらに、反応様式は、バッチ式でも連続式でも、いずれの形式でも実施することができる。

#### 【0135】

生成した16位水酸化マクロライド系化合物の単離及び精製は、一般に微生物代謝産物をその培養液から単離するために用いられる分離、精製の方法が利用できる。例えば、メタノール、エタノール、アセトン、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル、クロロホルム、トルエン等を用いた有機溶媒抽出、ダイヤイオンHP-20などの疎水性吸着樹脂を用いた吸脱着処理、セファデックスLH-20等を用いたゲル濾過クロマトグラフィー、活性炭、シリカゲル等による吸着クロマトグラフィー、もしくは薄層クロマトグラフィーによる吸脱着処理、あるいは逆相カラム等を用いた高速液体クロマトグラフィー等の公知のあらゆる方法がこれにあたる。また、ここに示した方法に特に限定されるものではない。これらの方法を単独あるいは任意の順序に組み合わせ、また反復して用いることにより、目的の16位水酸化マクロライド系化合物を単離精製することができる。

#### 【0136】

尚、本発明において、DNAの改変体とは、構成塩基の削除、変換、付加、挿入などにより修飾されたもの、あるいはその誘導体を意味し、もとのものと同じ効果を発現するDNAを意味する。

#### 【0137】

また、本願明細書において用いる「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を意味する。

#### 【0138】

本願明細書において用いる「C<sub>1-22</sub>アルキル基」とは、炭素数が1ないし22個の直鎖または分枝状アルキル基を示し、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基、n-ブチル基、iso-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、1,1-ジメチルプロピル基、1,2-ジメチルプロピル基、2,2-ジメチルプロピル基、1-エチルプロピル基、n-ヘキシル基、1-エチル-2-メチルプロピル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1-プロピルプロピル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,1-ジメチルブチル基、1,2-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、n-ヘプチル基

、*n*-オクチル基、*n*-ノニル基、*n*-デシル基等があげられ、好ましくは炭素数が1ないし6個の直鎖または分枝状アルキル基を示し、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*iso*-プロピル基、*n*-ブチル基、*iso*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等である。

#### 【0139】

本願明細書において用いる「不飽和C<sub>2-22</sub>アルキル基」とは、炭素数2ないし22個の直鎖または分枝状アルケニル基、あるいは炭素数が2ないし22個の直鎖または分枝状アルキニル基を示し、例えばビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、1-ペンテニル基、1-ヘキセニル基、1, 3-ヘキサンジエニル基、1, 6-ヘキサンジエニル基、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基、1-エチニル-2-プロピニル基、2-メチル-3-プロピニル基、1-ペンチニル基、1-ヘキシニル基、1, 3-ヘキサンジイニル基、1, 6-ヘキサンジイニル基等があげられ、好ましくは炭素数2ないし10個の直鎖または分枝状アルケニル基、あるいは炭素数が2ないし10個の直鎖または分枝状アルキニル基を示し、例えばビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基等である。

#### 【0140】

本願明細書において用いる「C<sub>6-14</sub>アリール基」とは、6ないし14個の炭素原子で構成された芳香族炭化水素環式基を意味し、例えば単環式基、および二環式基、三環式基等の縮合環も含まれる。例えばフェニル基、インデニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、アズレニル基、ヘプタレニル基、インダセニル基、アセナフチル基、フルオレニル基、フェナレニル基、フェナントレニル基、アントラセニル基等があげられ、好ましくはフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等である。

#### 【0141】

本願明細書における「5員環ないし14員環ヘテロアリール基」とは、窒素原子、硫黄原子および酸素原子からなる群より選ばれる複素原子を1個以上含んでなる単環式、二環式または三環式の5ないし14員芳香族複素環式基等をいう。好適な例をあげると、含窒素芳香族複素環式基としては、例えばピロリル基、ピリジル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、ベンゾトリアゾリル基、ピラゾリル基、イミダゾリル基、ベンツイミダゾリル基、インドリル基、イソインドリル基、インドリジニル基、プリニル基、インダゾリル基、キノリル基、イソキノリル基、キノリジル基、フタラジリル基、ナフチリジニル基、キノキサリル基、キナゾリニル基、シンノリニル基、プテリジニル基、イミダゾトリアジニル基、ピラジノピリダジニル基、アクリジニル基、フェナントリジニル基、カルバゾリル基、カルバゾリニル基、ペリミジニル基、フェナントロリニル基、フェナシニル基、イミダゾピリジニル基、イミダゾピリミジニル基、ピラゾロピリジニル基、ピラゾロピリジニル基等；含硫黄芳香族複素環式基としては、例えばチエニル基、ベンゾチエニル基等；含酸素芳香族複素環式基としては、例えばフリル基、ピラニル基、シクロペンタピラニル基、ベンゾフリル基、イソベンゾフリル基等；2個以上の異種複素原子を含んでなる芳香族複素環式基としては、例えばチアゾリル基、イソチアゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンズチアジアゾリル基、フェノチアジニル基、イソキサゾリル基、フラザニル基、フェノキサジニル基、オキサゾリル基、イソキサゾイル基、ベンゾオキサゾリル基、オキサジアゾリル基、ピラゾロオキサゾリル基、イミダゾチアゾリル基、チエノフラニル基、フロピロリル基、ピリドオキサジニル基等があげられ、好ましくはチエニル基、フリル基、ピリジル基、ピリダジリル基、ピリミジリル基、ピラジリル基等である。

#### 【0142】

本願明細書において用いる「3員環ないし14員環の含窒素非芳香族複素環」とは、窒素原子を1個以上含む単環式、二環式または三環式の3ないし14員環非芳香族複素環を



いう。好適な例をあげると、例えばアジリジニル基、アゼチジル基、ピロリジニル基、ピロリル基、ピペリジニル基、ピペラジニル基、ホモピペリジニル基、ホモピペラジニル基、イミダゾリル基、ピラゾリジニル基、イミダゾリジニル基、モルホルル基、イミダゾリニル基、オキサゾリニル基、キヌクリジル基等があげられる。また、当該含窒素非芳香族複素環には、ピリドン環から誘導される基や、非芳香族性の縮合環（例えばフタルイミド環、スクシンイミド環等から誘導される基）も含まれる。

#### 【0143】

本願明細書において用いる「C<sub>2-22</sub>アルカノイル基」とは、前記定義の「C<sub>1-22</sub>アルキル基」において、その末端がカルボニル基である基を意味し、例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、i s o -ブチリル基、バレリル基、i s o -バレリル基、ピバリル基、カプロイル基、デカノイル基、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、アラキドイル基等があげられ、好ましくは炭素数2ないし6個のアルカノイル基であり、例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、i s o -ブチリル基等である。

#### 【0144】

本願明細書において用いる「C<sub>7-15</sub>アロイル基」とは、前記定義の「C<sub>6-14</sub>アリール基」、「5員環ないし14員環ヘテロアリール基」において、その末端にカルボニル基が結合した基を意味し、例えばベンゾイル基、1-ナフトイル基、2-ナフトイル基、ピコリノイル基、ニコチノイル基、イソニコチノイル基、フロイル基等があげられる。

#### 【0145】

本願明細書において用いる「C<sub>3-23</sub>不飽和アルカノイル基」とは、前記定義の「不飽和C<sub>2-22</sub>アルキル基」において、その末端にカルボニル基が結合した基を意味し、例えばアクリロイル基、プロピオール基、クロトニル基、i s o -クロトニル基、オレイノル基、リノレノイル基等があげられ、好ましくは炭素数2ないし6個の不飽和アルカノイル基であり、例えばアクリロイル基等である。

#### 【0146】

本願明細書において用いる「C<sub>7-22</sub>アラルキル基」とは、前記定義の「C<sub>1-22</sub>アルキル基」において、置換可能な部分が前記定義の「C<sub>6-14</sub>アリール基」で置換される7ないし22個の炭素原子で構成された基を意味し、具体的には例えばベンジル基、フェネチル基、3-フェニルプロピル基、4-フェニルブチル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基等があげられ、好ましくは炭素数7ないし10個のアラルキル基であり、例えばベンジル基、フェネチル基等である。

#### 【0147】

本願明細書において用いる「C<sub>1-22</sub>アルコキシ基」とは、前記定義の「C<sub>1-22</sub>アルキル基」において、その末端に酸素原子が結合した基を意味し、好適な基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i s o -プロポキシ基、n-ブトキシ基、i s o -ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、i s o -ペンチルオキシ基、sec-ペンチルオキシ基、n-ヘキソキシ基、i s o -ヘキソキシ基、1, 1-ジメチルプロピルオキシ基、1, 2-ジメチルプロポキシ基、2, 2-ジメチルプロピルオキシ基、2-エチルプロポキシ基、1-エチル-2-メチルプロポキシ基、1, 1, 2-トリメチルプロポキシ基、1, 1, 2-トリメチルプロポキシ基、1, 1-ジメチルブトキシ基、1, 2-ジメチルブトキシ基、2, 2-ジメチルブトキシ基、2, 3-ジメチルブチルオキシ基、1, 3-ジメチルブチルオキシ基、2-エチルブトキシ基、1, 3-ジメチルブトキシ基、2-メチルペントキシ基、3-メチルペントキシ基、ヘキシルオキシ基等があげられる。

#### 【0148】

本願明細書において用いる「不飽和C<sub>2-22</sub>アルコキシ基」とは、前記定義の「不飽和C<sub>2-22</sub>アルキル基」において、その末端に酸素原子が結合した基を意味し、好適な基としては例えばビニロキシ基、アリロキシ基、1-プロペニルオキシ基、イソプロペニルオキシ基、2-メチル-1-プロペニルオキシ基、2-メチル-2-プロペニルオキシ基、1-

ブテニルオキシ基、2-ブテニルオキシ基、3-ブテニルオキシ基、1-ペンテニルオキシ基、1-ヘキセニルオキシ基、1, 3-ヘキサンジエニルオキシ基、1, 6-ヘキサンジエニルオキシ基、プロパルギルオキシ基、2-ブチニルオキシ基等があげられる。

#### 【0149】

本願明細書において用いる「C<sub>6-14</sub>アリールオキシ基」とは、前記定義の「C<sub>6-14</sub>アリール基」において、その末端に酸素原子が結合した基を意味し、具体的には例えばフェニルオキシ基、インデニルオキシ基、1-ナフチルオキシ基、2-ナフチルオキシ基、アズレニルオキシ基、ヘプタレニルオキシ基、インダセニルオキシ基、アセナフチルオキシ基、フルオレニルオキシ基、フェナレニルオキシ基、フェナントレニルオキシ基、アントラセニルオキシ基等があげられる。

#### 【0150】

本願明細書において用いる「5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基」とは、前記定義の「5員環ないし14員環ヘテロアリール基」において、その末端に酸素原子が結合した基を意味し、具体的には例えばピロリルオキシ基、ピリジルオキシ基、ピリダジニルオキシ基、ピリミジニルオキシ基、ピラジニルオキシ基、トリアゾリルオキシ基、テトラゾリルオキシ基、ベンゾトリアゾリルオキシ基、ピラゾリルオキシ基、イミダゾリルオキシ基、ベンツイミダゾリルオキシ基、インドリルオキシ基、イソインドリルオキシ基、インドリジニルオキシ基、プリニルオキシ基、インダゾリルオキシ基、キノリルオキシ基、イソキノリルオキシ基、キノリジルオキシ基、フタラジルオキシ基、ナフチリジニルオキシ基、キノキサリルオキシ基、キナゾリニルオキシ基、シンノリニルオキシ基、プテリジニルオキシ基、イミダゾトリアジニルオキシ基、ピラジノピリダジニルオキシ基、アクリジニルオキシ基、フェナントリジニルオキシ基、カルバゾリルオキシ基、カルバゾリニルオキシ基、ペリミジニルオキシ基、フェナントロリニルオキシ基、フェナシニルオキシ基、イミダゾピリジニルオキシ基、イミダゾピリミジニルオキシ基、ピラゾロピリジニルオキシ基、ピラゾロピリジニルオキシ基、チエニルオキシ基、ベンゾチエニルオキシ基、フリルオキシ基、ピラニルオキシ基、シクロペンタピラニルオキシ基、ベンゾフリルオキシ基、イソベンゾフリルオキシ基、チアゾリルオキシ基、イソチアゾリルオキシ基、ベンゾチアゾリルオキシ基、ベンズチアジアゾリルオキシ基、フェノチアジニルオキシ基、イソキサゾリルオキシ基、フラザニルオキシ基、フェノキサジニルオキシ基、オキサゾリルオキシ基、イソキサゾイルオキシ基、ベンゾオキサゾリルオキシ基、オキサジアゾリルオキシ基、ピラゾロオキサゾリルオキシ基、イミダゾチアゾリルオキシ基、チエノフラニルオキシ基、フロピロリルオキシ基、ピリドオキサジニルオキシ基等があげられ、好ましくはチエニルオキシ基、フリルオキシ基、ピリジルオキシ基、ピリダジニルオキシ基、ピリミジニルオキシ基、ピラジニルオキシ基である。

#### 【0151】

本願明細書において用いる「5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシアルキル基」とは、前記のC<sub>1-6</sub>アルキル基に前記の「5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基」が置換した基を示す。

#### 【0152】

本願明細書において用いる「C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニル基」とは、前記定義の「C<sub>1-22</sub>アルキル基」が結合したスルホニル基を意味し、具体的には例えばメチルスルホニル基、エチルスルホニル基、n-プロピルスルホニル基、iso-プロピルスルホニル基等があげられる。

#### 【0153】

本願明細書において用いる「C<sub>6-14</sub>アリールスルホニル基」とは、前記定義の「C<sub>6-14</sub>アリール基」が結合したスルホニル基を意味し、具体的には例えばベンゼンスルホニル基、1-ナフタレンスルホニル基、2-ナフタレンスルホニル基等があげられる。

#### 【0154】

本願明細書において用いる「C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニルオキシ基」とは、前記定義の「C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニル基」において、その末端に酸素原子が結合した基を意味し、例

例えば、メチルスルホニルオキシ基、エチルスルホニルオキシ基、*n*-プロピルスルホニルオキシ基、*iso*-プロピルスルホニルオキシ基等があげられる。

【0155】

本願明細書において用いる「置換基を有していても良い」の置換基とは、

(1) ハロゲン原子、

(2) 水酸基、

(3) チオール基、

(4) ニトロ基、

(5) ニトロソ基、

(6) シアノ基、

(7) カルボキシ基、

(8) ヒドロキシスルホニル基、

(9) アミノ基、

(10) C<sub>1-22</sub>アルキル基

(例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*iso*-プロピル基、*n*-ブチル基、*iso*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等)、

(11) 不飽和C<sub>2-22</sub>アルキル基

(例えば、ビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基等)、

(12) C<sub>6-14</sub>アリール基

(例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等)、

(13) 5員環ないし14員環ヘテロアリール基

(例えば、チエニル基、フリル基、ピリジル基、ピリダジル基、ピリミジル基、ピラジル基等)、

(14) 3員環ないし14員環含窒素非芳香族複素環

(例えば、アジリジニル基、アゼチジル基、ピロリジニル基、ピロリル基、ピペリジニル基、ピペラジニル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、イミダゾリル基、モルホルル基、イミダゾリニル基、オキサゾリニル基、キヌクリル基等)

(15) C<sub>1-22</sub>アルコキシ基

(例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*iso*-プロポキシ基、*sec*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*iso*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*tert*-ブトキシ基等)、

(16) C<sub>6-14</sub>アリールオキシ基

(例えば、フェニルオキシ基、1-ナフチルオキシ基、2-ナフチルオキシ基等)、

(17) C<sub>7-22</sub>アラキルオキシ基

(例えば、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基、3-フェニルプロピルオキシ基、4-フェニルブチルオキシ基、1-ナフチルメチルオキシ基、2-ナフチルメチルオキシ基等)

(18) 5員環ないし14員環ヘテロアリールオキシ基

(例えば、チエニルオキシ基、フリルオキシ基、ピリジルオキシ基、ピリダジルオキシ基、ピリミジルオキシ基、ピラジルオキシ基等)、

(19) C<sub>2-23</sub>アルカノイル基

(例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、*iso*-ブチリル基、バレリル基、*iso*-バレリル基、ピバリル基、カプロイル基、デカノイル基、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、アラキドイル基等)、

(20) C<sub>7-15</sub>アロイル基

(例えば、ベンゾイル基、1-ナフトイル基、2-ナフトイル基等)、

(21) C<sub>3-23</sub>不飽和アルカノイル基

(例えば、アクリル基、プロピオール基、クロトニル基、*iso*-クロトニル基、オレイノ

ル基、リノレノイル基等)、

(22) C<sub>2-23</sub>アルカノイルオキシ基

(例えば、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、アクリルオキシ基等)、

(23) C<sub>2-22</sub>アルコキシカルボニル基

(例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、n-プロポキシカルボニル基、iso-プロポキシカルボニル基、n-ブトキシカルボニル基、iso-ブトキシカルボニル基、sec-ブトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基等)

(24) 不飽和C<sub>3-22</sub>アルコキシカルボニル基

(ビニロキシカルボニル基、アリロキシカルボニル基、1-プロペニルオキシカルボニル基、イソプロペニルオキシカルボニル基、プロパルギルオキシカルボニル基、2-ブチニルオキシカルボニル基)、

(25) C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニル基

(例えば、メチルスルホニル基、エチルスルホニル基、n-プロピルスルホニル基、iso-プロピルスルホニル基等)、

(26) C<sub>6-14</sub>アリールスルホニル基

(例えば、ベンゼンスルホニル基、1-ナフタレンスルホニル基、2-ナフタレンスルホニル基等) および

(27) C<sub>1-22</sub>アルキルスルホニルオキシ基

(例えば、メチルスルホニルオキシ基、エチルスルホニルオキシ基、n-プロピルスルホニルオキシ基、iso-プロピルスルホニルオキシ基等)

からなる群から選ばれる基が挙げられる。

#### 【実施例】

##### 【0156】

参考例1(原料であるマクロライド系化合物11107Bの製造)

ストレプトミセス エスピー(Streptomyces sp.) Mer-11107株(FERM BP-7812)の斜面培養(ISP-2培地)から1白金耳を50mlの種母培地[グルコース2%、エスサンミート(味の素(株)製)1%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、殺菌前pH6.8]を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、28℃で2日間培養して第一段種母培養液を得た。この培養液0.1mlを同じ種母培地100mlを入れた500ml容の三角フラスコに接種し、28℃で1日間培養して第二段種母培養液を得た。このようにして得た第二段種母培養液800mlを生産培地[可溶性澱粉5%、ファルマメディアア0.8%、グルテンミール0.8%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム0.1%、殺菌前pH6.8]100Lを入れた200Lタンクに接種し、培養温度28℃で攪拌数90rpm、通気量1.0vvm、内圧20kPaの条件で5日間通気攪拌培養を行って培養液を得た。

##### 【0157】

このようにして得た培養液の一部(10L)を10Lの1-ブタノールにて抽出後、ブタノール層を減圧乾固し、100gの粗活性画分を得た。この粗活性画分をセファデックスLH-20(ファルマシア社製、1500ml)上に添加し、テトラヒドロフラン-メタノール(1:1)の溶媒で溶出した。540mlから660mlまでに溶出した画分を減圧下で濃縮乾固し、残渣(660mg)を得た。さらにこの残渣を酢酸エチルおよびメタノール(9:1;v/v)の混液に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ワコーゲルC-200、50g)に付した。このカラムをn-ヘキサンおよび酢酸エチル(1:9;v/v)の混液(2L)で溶出し、468mlから1260mlまでに溶出した画分を集め、減圧下で濃縮し、粗活性画分を25mg得た。

##### 【0158】

得られた粗活性画分を下記のHPLC分取条件(A)で分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に付し、保持時間34分に溶出される画分を集め、アセトニトリルを留去後、下記HPLC分取条件(B)にてその画分をHPLCによる脱塩を行うことによりマクロライド系化合物11107B(保持時間:37分)を6mg得た。

##### 【0159】

HPLC分取条件(A)

カラム: YMC-PACK ODS-AM SH-343-5AM,  $\phi$  20mm $\times$ 250mm(ワイエムシー社製)

温度: 室温

流速: 10ml/分

検出: 240nm

溶出液: アセトニトリル/0.15%リン酸二水素カリウム(pH3.5) (2:8 $\sim$ 8:2, v/v, 0 $\sim$ 50分, リニアグラジェント)

HPLC分取条件(B)

カラム: YMC-PACK ODS-AM SH-343-5AM,  $\phi$  20mm $\times$ 250mm(ワイエムシー社製)

温度: 室温

流速: 10ml/分

検出: 240nm

溶出液: メタノール/水(2:8 $\sim$ 10:0, v/v, 0 $\sim$ 40分, リニアグラジェント)。

#### 【0160】

実施例1: ストレプトマイセス・エスピー-A-1544株 (FERM BP-8446) 由来遺伝子の塩基配列の決定

(1) ストレプトマイセス・エスピー-A-1544株染色体のDNAの調製

グルコース1%、麦芽エキス0.4%、酵母エキス1%からなる培地にA-1544株を接種し、28℃、3日間培養した。得られた培養液を3000rpm、10分間遠心して菌体を集めた。その菌体からBlood & Cell Culture kit(QIAGEN社)を用いて染色体DNAを調製した。

#### 【0161】

(2) マクロライド系化合物11107の16位水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分的配列のクローニング

ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列を参考にして以下のようなミックス・プライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-3R)を設計し作成した(配列表の配列番号4および5参照)。

5Dm-3F: 5'-TTCGCSCTSCCSGTCCCSTCSATGGTSAT-3'

5Dm-3R: 5'-GTTGATSAYSAGSGTSGAGAA-3'

コドンの揺らぎを考慮して反応性を高めるために、混合塩基S(=C+G)、Y(=C+T)を使用した。

#### 【0162】

次に、この2種のプライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-3R)と前項(1)で得たA-1544株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングを50℃、2分間、伸長を68℃、30秒間行う3段階の反応を35回繰り返した。その結果、約500bpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-A1という)が増幅された。このDNA断片-A1は水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部である可能性が高い。PCR反応にて増幅したDNA断片-A1を、反応液からSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0163】

次に得られたDNA断片-A1の塩基配列を解析するに足る量のDNA断片-A1を得るために、プラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)にDNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)を用いてDNA断片-A1を連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。その後、アンピシリン(50 $\mu$ g/mL)、X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside; 40 $\mu$ g/mL)、IPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; 100 $\mu$ M)を含むL-Broth寒天培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天)を用いて、形質転換された大腸菌を選択した。こうして分離した形質転換大腸菌のコロニーをアンピシリン(50 $\mu$ g/mL)を含むL-Broth液体培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用いてプラスミドDNAの分離精製を行い、一定量のDNA断片-A1を得た。

#### 【0164】

(3) クローニングされたDNA断片-A1の塩基配列の解析

前項(2)で得られたDNA断片-A1の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンス法で解析した。塩基配列解析の結果、PCR反応で増幅されたDNA断片-A1は電気泳動で約500bpと測定されたが、塩基配列解析の結果、正確には528bpであることが明らかとなった(配列番号1の塩基1775～塩基2302参照)。クローニングされた前記の528bpのDNA配列の両端には前記のPCR反応の時に使用した2種類のプライマーに対応するDNA配列が見出されたので、前記のPCR反応ではDNA断片-A1がこの2種類のプライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-3R)により特異的に増幅されたことが明らかとなった。

#### 【0165】

##### (4) DNA断片-A1の周辺領域の解析

前記のとおり、A-1544株由来の水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分配列が決定されたのでインバースPCR法(細胞工学14巻、p.591-593,1995年)によって、クローニング断片の上流、下流域に広がる周辺領域の塩基配列を増幅、クローニング、配列解析した。すなわち、A-1544株染色体DNA((1)参照)をH緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中において制限酵素PstIとSalIでそれぞれ消化した。得られた各制限酵素切断DNA断片をDNA Ligation Kit ver.2(宝酒造社)を用いて自己環状化させた。

#### 【0166】

他方、DNA断片-A1の塩基配列から、以下のようなプライマー(6PIN-2Fおよび6PIN-2R)を設計し作成した(配列表の配列番号6および7参照)。

6PIN-2F: 5'-GCTGCGCCTGGCCCTGGAGGACATCGAGAT-3'

6PIN-2R: 5'-CTGTTCTCGAAGAACTCGTGGTCGGCGTA-3'

次にこの2種のプライマー(6PIN-2Fおよび6PIN-2R)と前記の自己環状化させたA-1544株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、5分間行う2段階の反応35回繰り返した。

#### 【0167】

この結果、約3.5kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-B1)と約2.8kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-C1)が増幅したが、これらは、水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAおよびその上流と下流領域を含むDNA配列を有するDNAである可能性が高い。

#### 【0168】

このPCR増幅反応液からDNA断片-B1およびDNA断片-C1をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。次に得られたDNA断片-B1およびDNA断片-C1について、塩基配列を解析するに足る量の各DNA断片を得るために、前記(2)と同様にプラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)、大腸菌JM109株およびプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用いて、一定量の各DNA断片を得た。

#### 【0169】

(5) DNA断片-B1(約3.5kbpのサイズ)およびDNA断片-C1(約2.8kbpのサイズ)の塩基配列の解析

前項(4)で得られたDNA断片-B1およびDNA断片-C1の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンス法で解析した。このように塩基配列の解析を行い、DNA断片-B1およびDNA断片-C1配列から、配列番号1に示された3793bpの塩基配列の情報を得た。

#### 【0170】

この3793bp中のオープン・リーディング・フレーム(ORF)を検索したところ、2種類のタンパク質がコードされていることが判明した。これらのタンパク質のアミノ酸配列をBLAST searchにて検索した結果、配列番号1の塩基1322～塩基2548にチトクロムP450と高い相同性を有する409個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするORF(以下、psmAという)が存在した。そしてpsmAは、ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列と、ストレプトマイセス・リビダンスのチトクロムP450(

CYP105D4)と推定されるアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(相同性72.6%)、さらにストレプトマイセス・グリセウスのチトクロムP450soy(SoyC)にも比較的高い相同性を有した(相同性69.4%)。このことからpsmAはチトクロムP450タイプの水酸化酵素をコードする遺伝子である可能性が高いと考えられた。

#### 【0171】

またpsmAのすぐ下流(配列番号1の塩基2564～塩基2761)には3F-4Sタイプのフェレドキシンに高い相同性を有するタンパク質をコードするORF(以下、psmBという)が存在した。psmBがコードするタンパク質は66個のアミノ酸からなり、ストレプトマイセス・セリカラ-A3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列のすぐ下流のフェレドキシンと推定されるアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(83.3%)、さらにストレプトマイセス・グリセウスのフェレドキシンsoy(soyB)にも比較的高い相同性を有した(相同性57.6%)。そのため、psmBは電子伝達を担い、psmAと共に水酸化を行うフェレドキシンをコードしていると考えられた。

#### 【0172】

実施例2: psmAおよびpsmBをもつ形質転換体の作成

(1) A-1544株由来のpsmAおよびpsmBの両方を含有するDNA断片の調製

実施例1において解析した配列番号1の塩基配列を参考にして、5'末端にNdeIサイトを付加したプライマーDM-NdeF(5'-GCCCCATATGACGGAAGTACGGACATCA-3': 配列番号8参照)および5'末端にSpeIサイトを付加したプライマーDM-SpeR(5'-GGGCCACTAGTCAGCCGGCCGGTTCGGTCA-3': 配列番号9参照)を設計し作成した。次に、この2種のプライマー(DM-NdeFおよびDM-SpeR)と実施例1(1)で得たA-1544株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、2分間行う2段階の反応を30回繰り返した。

#### 【0173】

この結果、psmAおよびpsmBを含む約1.5kbpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-D1という)が増幅された。このPCR増幅反応液からDNA断片-D1をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0174】

(2) プラスミドpTC-DMの構築

pT7NS-CamAB(PCT/JP03/04609)をH緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中で制限酵素NdeIとSpeIにより消化してプラスミド消化物を得た。同様に前項(1)で得たDNA断片-D1を制限酵素NdeIとSpeIで消化し、得られたDNA断片-D1の消化物とプラスミド消化物とを、DNA Ligation Kit ver.2(宝酒造)を用いて連結した。これによって、psmAおよびpsmBの両方を内部に含有するDNA断片-D1と、プラスミドpT7NS-CamABとが連結された約9.5kbpのサイズのプラスミド(プラスミドpTC-DMと称する)が構築された。

#### 【0175】

(3) 大腸菌形質転換株BL21(DE3)/pTC-DMの調製

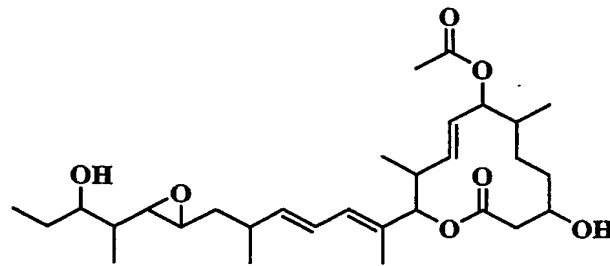
前項(2)で調製したプラスミドpTC-DMを用いて、大腸菌BL21(DE3)コンピテントセル(Novagen社)を形質転換した。こうして、プラスミドpTC-DMで形質転換された大腸菌BL21(DE3)/pTC-DM株を得た。

#### 【0176】

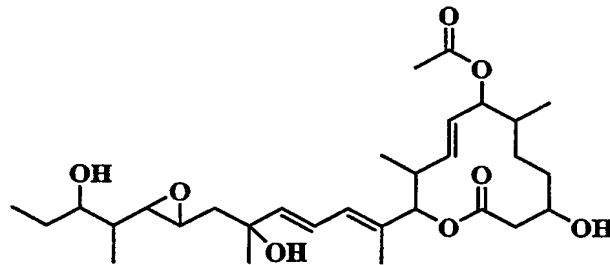
実施例3: psmAおよびpsmBをもつ大腸菌形質転換体による下記式で表されるME-265のME-282への変換

#### 【0177】

## 【化 59】



ME-265



ME-282

## 【0178】

## (1) 形質転換体反応液の調製

実施例 2 (3) で得た形質転換大腸菌 BL21 (DE3)/pTC-DM 株および BL21 (DE3)/pT7NS-CamAB 株の凍結種母をアンピシリン 50  $\mu$ g/mL を含む L-Broth 培地 (1.0% バクトトリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl) 3mL の入った 15mL 容の試験管に植菌し 37℃ で 20 時間振とう培養した。この種母培養液の 500  $\mu$ L をアンピシリン 50  $\mu$ g/mL を含む L-Broth 培地 (1.0% バクトトリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl) 50mL の入った 250mL 容の三角フラスコに植菌し 32℃ で 3 時間振とう培養した後、100mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を 50  $\mu$ L、80mg/mL 5-アミノレブリン酸を 50  $\mu$ L 順次添加し、32℃ で 6 時間振とう培養した。得られた培養液を遠心分離 (5000rpm、10 分間) し、菌体を集めた。これを 100mM リン酸緩衝液 (pH 6.1) 1.75mL に懸濁し、これに 80% グリセロールを 250  $\mu$ L、8mg/mL ME-265 を 50  $\mu$ L 添加した。こうして得られた変換反応液を 28℃、24 時間反応させた。反応液 200  $\mu$ L をアセトニトリル 1mL で抽出し、HPLC で ME-265 および ME-282 量を測定した。測定結果を表 3 に示す。

また、HPLC の詳しい条件を以下に示す。

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: CAPCELL PAK C18 SG120 ( $\phi$  4.6mm  $\times$  250mm)

移動相: 45% アセトニトリル (0~15分)

60% アセトニトリル (15~30分)

45% アセトニトリル (30~45分)

流速: 1mL/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 10  $\mu$ L

カラム温度: 40℃

分析時間: 45分

保持時間: ME-265 24.8分

ME-282 12.7分



【0179】

【表3】

mg/L	BL21 (DE3) /pT7NS-CamAB	BL21 (DE3) /pTC-DM
ME-265	143	0
ME-282	0	130

【0180】

(2) 形質転換体反応液からのME-282の取得

24時間反応した反応液1.8mLに水4mLを加え、酢酸エチル8mLで1回、4mLで2回抽出した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を除去した。得られた残渣を薄層クロマトグラフィー(MERCK Silicagel 60 F254 0.25mm 展開液;ヘキサン:酢酸エチル=1:2)により精製し、ME-282を0.2mg得た。

【0181】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(CD<sub>3</sub>OD, 500MHz):  $\delta$  ppm(積分, 多重度, 結合定数J(Hz)):

0.87(3H, d, J=7.0Hz), 0.90(3H, d, J=7.0Hz), 0.94(3H, t, J=7.3Hz), 0.97(3H, d, J=6.6Hz), 1.21-1.26(1H, m), 1.29-1.37(3H, m), 1.34(3H, s), 1.44-1.52(2H, m), 1.60-1.64(1H, m), 1.65(1H, d, J=6.2, 13.9Hz), 1.77(3H, d, J=1.1Hz), 1.86(1H, dd, J=5.4, 13.9Hz), 1.89-1.94(1H, m), 2.00(3H, s), 2.43(1H, dd, J=5.5, 13.9Hz), 2.50-2.60(1H, m), 2.56(1H, dd, J=3.3, 13.9Hz), 2.66(1H, dd, J=2.2, 7.7Hz), 2.89(1H, dt, J=2.2, 6.2Hz), 3.52(1H, dt, J=4.8, 8.4Hz), 3.75-3.80(1H, m), 4.90(1H, overlapped with D<sub>2</sub>O), 5.01(1H, d, J=10.6Hz), 5.42(1H, dd, J=9.2, 15.0Hz), 6.13(1H, d, J=10.6Hz), 6.52(1H, dd, J=11.0, 15.0Hz)。

【0182】

この結果、コントロールである大腸菌BL21(DE3)/pT7NS-CamAB株ではME-282とみられるピークは得られなかったのに対して、psmAおよびpsmBを含むBL21(DE3)/pTC-DM株では、ME-265をほとんど消費してME-282とみられるピークが得られた。このことより、psmAおよびpsmBがME-265からME-282への変換に関与していることを示唆している。

【0183】

実施例4: psmAおよびpsmBをもつ大腸菌形質転換体によるマクロライド系化合物11107Bのマクロライド系化合物11107Dへの変換

(1) 形質転換体反応液の調製

実施例3と同様にマクロライド系化合物11107Bを基質とした試験を行った。実施例2(3)で得た形質転換大腸菌BL21(DE3)/pTC-DM株、およびBL21(DE3)/pT7NS-CamAB株の凍結種母をアンピシリン50 $\mu$ g/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)3mLの入った15mL容の試験管に植菌し30℃で20時間振とう培養した。この種母培養液の500 $\mu$ Lをアンピシリン50 $\mu$ g/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)50mLの入った250mL容の三角フラスコに植菌し28℃で5時間振とう培養した後、100mM IPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)を50 $\mu$ L、80mg/mL 5-アミノレブリン酸を50 $\mu$ L順次添加し、25℃で20時間振とう培養した。得られた培養液を遠心分離(5000rpm、10分間)し、菌体を集めた。これを100mMリン酸緩衝液(pH6.1)1.75mLに懸濁し、これに80%グリセロールを250 $\mu$ L、40mg/mL 11107Bを50 $\mu$ L添加した。こうして得られた変換反応液を28℃、24時間反応させた。反応液200 $\mu$ Lをアセトニトリル1mLで抽出し、HPLCでマクロライド系化合物11107Bおよび11107Dの量を測定した。その測定結果を表4に示す。また、HPLCの詳しい条件を以下に示す。

【0184】

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: CAPCELL PAK C18 SG120( $\phi$  4.6mm $\times$ 250mm)

移動相: 35% アセトニトリル(0~10分)

35%～65% アセトニトリル(10～12分)

65% アセトニトリル(12～15分)

35% アセトニトリル(15～20分)

流速: 1mL/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 10 $\mu$ L

カラム温度: 40℃

分析時間: 20分

保持時間: 11107B 14.3分

11107D 7.9分

【0185】

【表4】

mg/L	BL21 (DE3) /pT7NS-CamAB	BL21 (DE3) /pTC-DM
11107B	636	619
11107D	0	71

【0186】

(2) 形質転換体反応液からのマクロライド系化合物11107Dの取得

24時間反応した反応液1.8mLに水4mLを加え、酢酸エチル8mLで1回、4mLで2回抽出した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を除去した。得られた残渣を薄層クロマトグラフィー(MERCK Silicagel 60 F254 0.25mm 展開液; 酢酸エチル)により精製し、11107Dを0.1mg得た。

【0187】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(CD<sub>3</sub>OD, 500MHz):  $\delta$  ppm(積分, 多重度, 結合定数J(Hz)):

0.87(3H, d, J=7.0Hz), 0.88(3H, d, J=7.0Hz), 0.93(3H, t, J=7.0Hz), 1.18(3H, s), 1.18-1.69(8H, m), 1.33(3H, s), 1.77(3H, d, J=1.1Hz), 1.82-1.90(1H, m), 2.05(3H, s), 2.49-2.60(3H, m), 2.66(1H, dd, J=2.2, 8.2Hz), 2.89(1H, dt, J=2.4, 5.7Hz), 3.52(1H, dt, J=4.8, 8.3Hz), 3.73-3.82(1H, m), 5.04(1H, d, J=9.8Hz), 5.05(1H, d, J=10.6Hz), 5.56(1H, dd, J=9.8, 15.2Hz), 5.70(1H, dd, J=9.8, 15.2Hz), 5.86(1H, d, J=15.2Hz), 6.3(1H, d, J=10.8Hz), 6.52(1H, dd, J=10.8, 15.2Hz)。

【0188】

この結果、コントロールである大腸菌BL21(DE3)/pT7NS-CamAB株ではマクロライド系化合物11107Dとみられるピークは得られなかったのに対して、psmAおよびpsmBを含むBL21(DE3)/pTC-DM株では、マクロライド系化合物11107Dとみられるピークが得られた。このことより、psmAおよびpsmBがマクロライド系化合物11107Bから11107Dへの変換に関与していることを示唆している。

【0189】

実施例5: A-1544セルフクローニング株での変換試験

(1) A-1544株由来のpsmAおよびpsmBの両方を含有するDNA断片の調製(セルフクローニング用)

実施例1において解析した配列番号1の塩基配列を参考にして、5'末端にBglIIIサイトを付加したプライマーDM-BglF(5'-CGCATAGATCTTCACCCGAGCGGGTGATCA-3': 配列番号10参照)および5'末端にBglIIIサイトを付加したプライマーDM-BglR(5'-TCCCGAGATCTTGAAGGTCCGCGTCACCGT-3': 配列番号11参照)を設計し作成した。

【0190】

次に、この2種のプライマー(DM-BglFおよびDM-BglR)と実施例1(1)で得たA-1544株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造

社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングを63℃、30秒間、伸長を68℃、4分間行う3段階の反応を30回繰り返した。

#### 【0191】

この結果、psmAおよびpsmBを含む約3.5kbpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-E1という)が増幅された。このPCR増幅反応液を、アガロースゲル電気泳動にかけて分画した。上記の約3.5kbpの大きさのDNA断片-E1をアガロースゲルから切り出して、SUPREC 01(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0192】

##### (2) プラスミドpIJDMGの構築

pIJ702をH緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ジチオスレイトール, 100mM NaCl)中で制限酵素BglIIIにより消化してプラスミド消化物を得た。同様に前項(1)で得たDNA断片-E1を制限酵素BglIIIで消化し、得られたDNA断片-E1の消化物とプラスミド消化物とを、DNA Ligation Kit ver.2(宝酒造)を用いて連結した。これによって、psmAおよびpsmBの両方を内部に含有するDNA断片-E1と、プラスミドpIJ702とが連結された約8.5kbpのサイズのプラスミド(プラスミドpIJDMGと称する)が構築された。

#### 【0193】

##### (3) セルフクローニング株A-1544/pIJDMG株の調製

前項(2)で調製したプラスミドpIJDMGを用い、A-1544株を、Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, 1985に記載された方法に従い形質転換した。こうして、プラスミドpIJDMGで形質転換されたA-1544/pIJDMG株を得た。

#### 【0194】

実施例6: セルフクローニング株による11107Bから11107Dへの変換

実施例5(3)で得た形質転換体A-1544/pIJDMG株、A-1544/pIJ702株、および元のA-1544株の凍結種母を、チオストレプトン25μg/mLを含むSMN培地(スタビロース2%、グルコース2%、エスサンミート2%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.25%、CaCO<sub>3</sub> 0.32% pH7.4)50mLの入った250mL容の三角フラスコに植菌し28℃で48時間振とう培養した(種母培養、但し、A-1544株にはチオストレプトンを加えない)。得られた種母培養液の0.5mLをチオストレプトン25μg/mLを含むSMN培地50mLの入った250mL容の三角フラスコに植菌し28℃で72時間振とう培養した(但し、A-1544株にはチオストレプトンを加えない)。得られた培養液2mLを分注し、これに1Mリン酸緩衝液(pH6.5)を100μL、40mg/mL 11107Bを50μL添加した。こうして得られた変換培養液を28℃、12時間反応させた。反応液200μLをアセトニトリル1mLで抽出し、HPLCで11107Bおよび11107D量を測定した。測定結果を表5に示す。また、HPLCの詳しい条件を以下に示す。

#### 【0195】

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: CAPCELL PAK C18 SG120(φ4.6mm×250mm)

移動相: 35% アセトニトリル(0~10分)

35%~65% アセトニトリル(10~12分)

65% アセトニトリル(12~15分)

35% アセトニトリル(15~20分)

流速: 1mL/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 10μL

カラム温度: 40℃

分析時間: 20分

保持時間: 11107B 14.3分

11107D 7.9分

#### 【0196】

【表 5】

mg/L	A-1544株	A-1544/pIJ702株	A-1544/pIJDMG株
11107B	496	651	14
11107D	196	0	535

## 【0197】

この結果、psmAおよびpsmBを含むプラスミドが形質転換されたA-1544/pIJDMG株は、元のA-1544株に比べ、12時間の反応で約2.7倍の変換活性を示した。このことは、psmAおよびpsmBのセルフクローニングが、マクロライド系化合物11107Bから11107Dへの変換に貢献できることを示唆している。

## 【0198】

実施例7：ストレプトマイセス・エスピーMer-11107株 (FERM BP-7812) 由来遺伝子の塩基配列の決定

(1) ストレプトマイセス・エスピーMer-11107株染色体のDNAの調製

グルコース1%、麦芽エキス0.4%、酵母エキス1%からなる培地にMer-11107株を接種し、28℃、3日間培養した。得られた培養液を3000rpm、10分間遠心して菌体を集めた。その菌体からBlood & Cell Culture kit(QIAGEN社)を用いて染色体DNAを調製した。

## 【0199】

(2) マクロライド系化合物11107の16位水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分的配列のクローニング

ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列を参考にして以下のようなミックス・プライマー(5Dm-3Fおよび5D-1R)を設計し作成した(配列表の配列番号4および12参照)。

5Dm-3F: 5'-TTCGCSCSTCCSGTCCCSTCSATGGTSAT-3'

5D-1R: 5'-AGGTGCCCAGCGAGATCATGTT-3'

コドンの揺らぎを考慮して反応性を高めるために、混合塩基S(=C+G)、Y(=C+T)を使用した。

## 【0200】

次に、この2種のプライマー(5Dm-3Fおよび5D-1R)と前項(1)で得たMer-11107株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングを50℃、2分間、伸長を68℃、30秒間行う3段階の反応を35回繰り返した。その結果、約300bpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-A2という)が増幅された。このDNA断片-A2は水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部である可能性が高い。PCR反応にて増幅したDNA断片-A2を、反応液からSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

## 【0201】

次に得られたDNA断片-A2の塩基配列を解析するに足る量のDNA断片-A2を得るために、プラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)にDNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)を用いてDNA断片-A2を連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。その後、アンピシリン(50μg/mL)、X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside; 40μg/mL)、IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 100μM)を含むL-Broth寒天培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天)を用いて、形質転換された大腸菌を選択した。こうして分離した形質転換大腸菌のコロニーをアンピシリン(50μg/mL)を含むL-Broth液体培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用

いてプラスミドDNAの分離精製を行い、一定量のDNA断片-A2を得た。

#### 【0202】

##### (3) クローニングされたDNA断片-A2の塩基配列の解析

前項(2)で得られたDNA断片-A2の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンス法で解析した。塩基配列解析の結果、PCR反応で増幅されたDNA断片-A2は電気泳動で約300bpと測定されたが、塩基配列解析の結果、正確には325bpであることが明らかとなった(配列番号2の塩基837～塩基1161参照)。クローニングされた前記の325bpのDNA配列の両端には前記のPCR反応の時に使用した2種類のプライマーに対応するDNA配列が見出されたので、前記のPCR反応ではDNA断片-A2がこの2種類のプライマー(5Dm-3Fおよび5D-1R)により特異的に増幅されたことが明らかとなった。

#### 【0203】

##### (4) DNA断片-A2の周辺領域の解析

前記のとおり、Mer-11107株由来の水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分的配列が決定されたのでインバースPCR法(細胞工学14巻、p.591-593,1995年)によって、クローニング断片の上流、下流域に広がる周辺領域の塩基配列を増幅、クローニング、配列解析した。すなわち、Mer-11107株染色体DNA((1)参照)を、K緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 8.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM KCl)中で制限酵素BamHIで、H緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中で制限酵素SalIでそれぞれ消化した。得られた各制限酵素切断DNA断片をDNA Ligation Kit ver.2(宝酒造社)を用いて自己環状化させた。

#### 【0204】

他方、DNA断片-A2の塩基配列から、以下のようなプライマー(7PIN-2Fおよび6PIN-2R)を設計し作成した(配列番号13および7参照)。

7PIN-2F: 5'-CCATGATCCTGCTGGTGGCCGCCATGAGA-3'

6PIN-2R: 5'-CTGTTCTCTCGAAGAACTCGTGGTCGGCGTA-3'

次にこの2種のプライマー(7PIN-2Fおよび6PIN-2R)と前記の自己環状化させたMer-11107株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、5分間行う2段階の反応35回繰り返した。

#### 【0205】

この結果、約1.3kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-B2)と約1.4kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-C2)が増幅したが、これらは、水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAおよびその上流と下流領域を含むDNA配列を有するDNAである可能性が高い。

#### 【0206】

このPCR増幅反応液からDNA断片-B2およびDNA断片-C2をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。次に得られたDNA断片-B2およびDNA断片-C2について、塩基配列を解析するに足る量の各DNA断片を得るために、前記(2)と同様にプラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)、大腸菌JM109株およびプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用いて、一定量の各DNA断片を得た。

#### 【0207】

##### (5) DNA断片-B2(約1.3kbpのサイズ)およびDNA断片-C2(約1.4kbpのサイズ)の塩基配列の解析

前項(4)で得られたDNA断片-B2およびDNA断片-C2の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンス法で解析した。このように塩基配列の解析を行い、DNA断片-B2およびDNA断片-C2配列から、配列番号2に示された2329bpの塩基配列の情報を得た。

#### 【0208】

この2329bp中のオープン・リーディング・フレーム(ORF)を検索したところ、2種類のタンパク質がコードされていることが判明した。これらのタンパク質のアミノ酸配列をBLAS

T searchにて検索した結果、配列番号2の塩基420～塩基1604にチトクロムP450と高い相同性を有する395個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするORF(以下、bpmAという)が存在した。そしてbpmAは、A-1544株から単離したpsmAのアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(相同性67.4%)、さらにストレプトマイセス・グリセウスのチトクロムP450soy(SoyC)にも比較的高い相同性を有した(相同性64.8%)。このことからbpmAがチトクロムP450タイプの水酸化酵素をコードする可能性が高いと考えられた。

#### 【0209】

またbpmAのすぐ下流(配列番号2の塩基1643～塩基1834)には3Fe-4Sタイプのフェレドキシンに高い相同性を有するタンパク質をコードするORF(以下、bpmBという)が存在した。bpmBがコードするタンパク質は64個のアミノ酸からなり、A-1544株から単離したpsmBのアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(相同性81.0%)、さらにストレプトマイセス・セリカラA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列のすぐ下流のフェレドキシンと推定されるアミノ酸配列にも比較的高い相同性を有した(76.2%)。そのため、bpmBは電子伝達を担い、bpmAと共に水酸化を行うものと考えられた。

#### 【0210】

実施例8: bpmAおよびbpmBをもつ形質転換体の作成

(1) Mer-11107株由来のbpmAおよびbpmBの両方を含有するDNA断片の調製

実施例7において解析した配列番号2の塩基配列を参考にして、5'末端にNdeIサイトを付加したプライマー07-NdeF(5'-GCCCCATATGACCGAAGCCATCCCCTACTT-3': 配列番号14参照)および5'末端にSpeIサイトを付加したプライマー07-SpeR(5'-GCCACTAGTGCTAATCGTCGGTGACCGCAA-3': 配列番号15参照)を設計し作成した。次に、この2種のプライマー(07-NdeFおよび07-SpeR)と実施例7(1)で得たMer-11107株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、2分間行う2段階の反応を30回繰り返した。

#### 【0211】

この結果、bpmAおよびbpmBを含む約1.5kbpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-D2という)が増幅された。このPCR増幅反応液からDNA断片-D2をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0212】

(2) プラスミドpTC-D07の構築

pT7NS-CamAB(PCT/JP03/04609)をH緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中で制限酵素NdeIとSpeIにより消化してプラスミド消化物を得た。同様に前項(1)で得たDNA断片-D2を制限酵素NdeIとSpeIで消化し、得られたDNA断片-D2の消化物とプラスミド消化物とを、DNA Ligation Kit ver.2(宝酒造)を用いて連結した。これによって、bpmAおよびbpmBの両方を内部に含有するDNA断片-D2と、プラスミドpT7NS-CamABとが連結された約9.5kbpのサイズのプラスミド(プラスミドpTC-D07と称する)が構築された。

#### 【0213】

(3) 大腸菌形質転換株BL21(DE3)/pTC-D07の調製

前項(2)で調製したプラスミドpTC-D07を用いて、大腸菌BL21(DE3)コンピテントセル(No vagen社)を形質転換した。こうして、プラスミドpTC-D07で形質転換された大腸菌BL21(DE3)/pTC-D07株を得た。

#### 【0214】

実施例9: bpmAおよびbpmBをもつ大腸菌形質転換体によるマクロライド系化合物11107Bの11107Dへの変換

実施例8(3)で得た形質転換大腸菌BL21(DE3)/pTC-D07株およびBL21(DE3)/pT7NS-CamAB株の凍結種母をアンピシリン50μg/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)3mLの入った15mL容の試験管に植菌し37℃で20時間振とう培養した。この種母培養液の500μLをアンピシリン50μg/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクト

リプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)50mLの入った250mL容の三角フラスコに植菌し32℃で4時間振とう培養した後、100mM IPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)を50 $\mu$ L、80mg/mL 5-アミノレブリン酸を50 $\mu$ L順次添加し、32℃で5時間振とう培養した。得られた培養液を遠心分離(5000rpm、10分間)し、菌体を集めた。これを100mMリン酸緩衝液(pH6.1)1.75mLに懸濁し、これに80%グリセロールを250 $\mu$ L、40mg/mL マクロライド系化合物11107Bを12.5 $\mu$ L添加した。こうして得られた変換反応液を28℃、24時間反応させた。反応液400 $\mu$ Lをメタノール600 $\mu$ Lで抽出し、HPLCでマクロライド系化合物11107Bおよび11107Dの量を測定した。その測定結果を表6に示す。また、HPLCの詳しい条件を以下に示す。

## 【0215】

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: Develosil ODS UG-3( $\phi$ 4.6mm $\times$ 250mm 3 $\mu$ m)

移動相: 45%～55% メタノール(0～5分)

55% メタノール(5～13分)

55%～70% メタノール(13～17分)

70% メタノール(17～21分)

45% メタノール(21～25分)

流速: 1.2mL/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 5 $\mu$ L

カラム温度: 40℃

分析時間: 25分

保持時間: 11107B 12.2分

11107D 4.2分

## 【0216】

## 【表6】

mg/L	BL21 (DE3) /pT7NS-CamAB	BL21 (DE3) /pTC-D07
11107B	162	156
11107D	0.00	0.78

## 【0217】

この結果、コントロールである大腸菌BL21(DE3)/pT7NS-CamAB株ではマクロライド系化合物11107Dのピークは得られなかったのに対して、bpmAおよびbpmBを含むBL21(DE3)/pTC-D07株では、マクロライド系化合物11107Dのピークが得られた。このことより、bpmAおよびbpmBがマクロライド系化合物11107Bから11107Dへの変換に関与していることを示唆している。

## 【0218】

実施例10: A-1560株(FERM P-19585)由来遺伝子の塩基配列の決定

(1) A-1560株染色体のDNAの調製

グルコース1%、麦芽エキス0.4%、酵母エキス1%からなる培地にA-1560株を接種し、28℃、3日間培養した。得られた培養液を3000rpm、10分間遠心して菌体を集めた。その菌体からBlood & Cell Culture kit(QIAGEN社)を用いて染色体DNAを調製した。

## 【0219】

(2) マクロライド系化合物11107の16位水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分的配列のクローニング

ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列を参考にして以下のようなミックス・プライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-2R)を設計し

作成した(配列表の配列番号4および16参照)。

5Dm-3F: 5'-TTCGCSCTSCCSGTCCCSTCSATGGTSAT-3'

5Dm-2R: 5'-CTGGATSGTGTCCSGGYTT-3'

コドンの揺らぎを考慮して反応性を高めるために、混合塩基S(=C+G)、Y(=C+T)を使用した。

#### 【0220】

次に、この2種のプライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-2R)と前項(1)で得たA-1560株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングを50℃、2分間、伸長を68℃、30秒間行う3段階の反応を35回繰り返した。その結果、約750bpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-A3という)が増幅された。このDNA断片-A3は水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部である可能性が高い。PCR反応にて増幅したDNA断片-A3を、反応液からSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0221】

次に得られたDNA断片-A3の塩基配列を解析するに足る量のDNA断片-A3を得るために、プラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)にDNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)を用いてDNA断片-A3を連結し、大腸菌JM109株(Stratagene社)を形質転換した。その後、アンピシリン(50μg/mL)、X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside; 40μg/mL)、IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 100μM)を含むL-Broth寒天培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天)を用いて、形質転換された大腸菌を選択した。こうして分離した形質転換大腸菌のコロニーをアンピシリン(50μg/mL)を含むL-Broth液体培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用いてプラスミドDNAの分離精製を行い、一定量のDNA断片-A3を得た。

#### 【0222】

(3) クローニングされたDNA断片-A3の塩基配列の解析

前項(2)で得られたDNA断片-A3の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンス法で解析した。塩基配列解析の結果、PCR反応で増幅されたDNA断片-A3は電気泳動で約750bpと測定されたが、塩基配列解析の結果、正確には741bpであることが明らかとなった(配列番号3の塩基616～塩基1356参照)。クローニングされた前記の741bpのDNA配列の両端には前記のPCR反応の時に使用した2種類のプライマーに対応するDNA配列が見出されたので、前記のPCR反応ではDNA断片-A3がこの2種類のプライマー(5Dm-3Fおよび5Dm-2R)により特異的に増幅されたことが明らかとなった。

#### 【0223】

(4) DNA断片-A3の周辺領域の解析

前記のとおり、A-1560株由来の水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分配列が決定されたのでインバースPCR法(細胞工学14巻、p.591-593, 1995年)によって、クローニング断片の上流、下流域に広がる周辺領域の塩基配列を増幅、クローニング、配列解析した。すなわち、A-1560株染色体DNA((1)参照)を、K緩衝液(50mM Tris-HCl, pH8.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM KCl)中において制限酵素BamHIで、L緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール)中において制限酵素KpnIで、H緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中において制限酵素SalIでそれぞれ消化した。得られた各制限酵素切断DNA断片をDNA Ligation Kit ver.2(宝酒造社)を用いて自己環状化させた。

#### 【0224】

他方、DNA断片-A3の塩基配列から、以下のようなプライマー(5PIN-2Fおよび6PIN-2R)を設計し作成した(配列表の配列番号17および7参照)。

5PIN-2F: 5'-CGGAATCCACCACTGCCTCGGCCAGAACCT-3'

6PIN-2R: 5'-CTGTTCTCGAAGAACTCGTGGTCGGCGTA-3'



次にこの2種のプライマー(5PIN-2Fおよび6PIN-2R)と前記の自己環状化させたA-1560株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、5分間行う2段階の反応35回繰り返した。

#### 【0225】

この結果、約4.5kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-B3)と約3.0kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-C3と約1.7kbpの大きさのDNA断片(DNA断片-D3)が増幅したが、これらは、水酸化活性を有するタンパク質をコードするDNAおよびその上流と下流領域を含むDNA配列を有するDNAである可能性が高い。

#### 【0226】

このPCR増幅反応液からDNA断片-B3およびDNA断片-C3およびDNA断片-D3をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。次に得られたDNA断片-B3およびDNA断片-C3およびDNA断片-D3について、塩基配列を解析するに足る量の各DNA断片を得るために、前記(2)と同様にプラスミドベクターpT7Blue T(Novagen社)、DNA Ligation kit ver.2(宝酒造社)、大腸菌JM109株およびプラスミド精製キット(QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)を用いて、一定量の各DNA断片を得た。

#### 【0227】

(5) DNA断片-B3(約4.5kbpのサイズ)、DNA断片-C3(約3.0kbpのサイズ)およびDNA断片-D3(約1.7kbpのサイズ)の塩基配列の解析

前項(4)で得られたDNA断片-B3、DNA断片-C3およびDNA断片-D3の塩基配列をDNA塩基配列解析装置(PE Biosystems 377XL)を用い、ダイターミネーター・サイクル・シーケンシング法で解析した。このように塩基配列の解析を行い、DNA断片-B3、DNA断片-C3およびDNA断片-D3の配列の中から、配列番号3に示された1860bpの塩基配列の情報を得た。

#### 【0228】

この1860bp中のオープン・リーディング・フレーム(ORF)を検索したところ、2種類のタンパク質がコードされていることが判明した。これらのタンパク質のアミノ酸配列をBLAST searchにて検索した結果、配列番号3の塩基172～塩基1383にチトクロムP450と高い相同性を有する404個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするORF(以下、tpmAという)が存在した。そしてtpmAは、ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(相同性77.4%)、A-1544株から単離したpsmAのアミノ酸配列にも高い相同性を有した(相同性76.6%)。このことからtpmAはチトクロムP450タイプの水酸化酵素をコードする遺伝子である可能性が高いと考えられた。

#### 【0229】

またtpmAのすぐ下流(配列番号3の塩基1399～塩基1593)には3Fe-4Sタイプのフェレドキシンに高い相同性を有するタンパク質をコードするORF(以下、tpmBという)が存在した。tpmBがコードするタンパク質は65個のアミノ酸からなり、A-1544株から単離したpsmBのアミノ酸配列に最も高い相同性を有し(相同性81.0%)、ストレプトマイセス・セリカラーA3(2)のチトクロムP450(CYP105D5)と推定されるアミノ酸配列のすぐ下流のフェレドキシンと推定されるアミノ酸配列にも高い相同性を有した(82.5%)。そのため、tpmBは電子伝達を担い、tpmAと共に水酸化を行うフェレドキシンをコードしていると考えられた。

#### 【0230】

実施例11: tpmAおよびtpmBをもつ形質転換体の作成

(1) A-1560株由来のtpmAおよびtpmBの両方を含有するDNA断片の調製

実施例10において解析した配列番号3の塩基配列を参考にして、5'末端にNdeIサイトを付加したプライマーtpm-NdeF(5'-GGCCCCATATGACAGACACGACAGACCTGA-3': 配列番号18参照)および5'末端にSpeIサイトを付加したプライマーtpm-SpeR(5'-GCGCGACTAGTCCCCCTACCCGTCCTCGGA-3': 配列番号19参照)を設計し作成した。次に、この2種のプライマー(tpm-NdeFおよびtpm-SpeR)と実施例10(1)で得たA-1560株染色体DNAをテンプレートとして用いてPCR反応を行った。PCR反応は、Takara LA Taq(宝酒造社)とPCR増幅装置(Biometra

a社 T Gradient)を用い、変性を98℃、20秒間、アニーリングと伸長を68℃、2分間行う2段階の反応を30回繰り返した。

#### 【0231】

この結果、tpmAおよびtpmBを含む約1.5kbpの大きさのDNA断片(以下、DNA断片-E3という)が増幅された。このPCR増幅反応液からDNA断片-E3をSUPREC PCR(宝酒造社)によって回収した。

#### 【0232】

##### (2) プラスミドpTC-tpmABの構築

pT7NS-CamAB(PCT/JP03/04609)をH緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール, 100mM NaCl)中で制限酵素NdeIとSpeIにより消化してプラスミド消化物を得た。同様に前項(1)で得たDNA断片-E3を制限酵素NdeIとSpeIで消化し、得られたDNA断片-E3の消化物とプラスミド消化物とを、DNA Ligation Kit ver.2(宝酒造)を用いて連結した。これによって、tpmAおよびtpmBの両方を内部に含有するDNA断片-E3と、プラスミドpT7NS-CamABとが連結された約9.5kbpのサイズのプラスミド(プラスミドpTC-tpmABと称する)が構築された。

#### 【0233】

##### (3) 大腸菌形質転換株BL21(DE3)/pTC-tpmABの調製

実施例11(2)で調製したプラスミドpTC-tpmABを用いて、大腸菌BL21(DE3)コンピテンセル(Novagen社)を形質転換した。こうして、プラスミドpTC-tpmABで形質転換された大腸菌BL21(DE3)/pTC-tpmAB株を得た。

#### 【0234】

実施例12: tpmAおよびtpmBをもつ大腸菌形質転換体による11107Bの11107Dへの変換  
前項(3)で得た形質転換大腸菌BL21(DE3)/pTC-tpmAB株、およびBL21(DE3)/pT7NS-CamAB株の凍結種母をアンピシリン50μg/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)3mLの入った15mL容の試験管に植菌し37℃で20時間振とう培養した。この種母培養液の500μLをアンピシリン50μg/mLを含むL-Broth培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)50mLの入った250mL容の三角フラスコに植菌し32℃で4時間振とう培養した後、100mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)を50μL、80mg/mL 5-アミノレブリン酸を50μL順次添加し、32℃で5時間振とう培養した。得られた培養液を遠心分離(5000rpm、10分間)し、菌体を集めた。これを100mMリン酸緩衝液(pH6.1)1.75mLに懸濁し、これに80%グリセロールを250μL、40mg/mL 11107Bを12.5μL添加した。こうして得られた変換反応液を28℃、24時間反応させた。反応液400μLをメタノール600μLで抽出し、HPLCで11107Bおよび11107Dの量を測定した。その測定結果を表7に示す。また、HPLCの詳しい条件を以下に示す。

#### 【0235】

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: Develosil ODS UG-3(φ4.6mmx250mm 3μm)

移動相: 45%~55%メタノール(0~5分)

55% メタノール(5~13分)

55%~70% メタノール(13~17分)

70% メタノール(17~21分)

45% メタノール(21~25分)

流速: 1.2mL/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 5μL

カラム温度: 40℃

分析時間: 25分

保持時間: 11107B 12.2分

11107D 4.2分

#### 【0236】

【表 7】

mg/L	BL21 (DE3) /pT7NS-CamAB	BL21 (DE3) /pTC-tpmAB
11107B	141	128
11107D	0	18

## 【 0 2 3 7 】

この結果、コントロールである大腸菌BL21(DE3)/pT7NS-CamAB株では11107Dのピークは得られなかったのに対して、tpmAおよびtpmBを含むBL21(DE3)/pTC-tpmAB株では、11107Dのピークが得られた。このことより、tpmAおよびtpmBが11107Bから11107Dへの変換に関与していることを示唆している。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mercian Corporation

Eisai Co., Ltd

&lt;120&gt; マクロライド系化合物の水酸化に関与するDNA

&lt;130&gt; 103EZ007

&lt;160&gt; 19

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3793

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1322)..(2548)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2564)..(2761)

&lt;400&gt; 1

```

ctgcagctcg acgtgcgggt cggacttcac gttgaagtac cagaccggat gcttgggcgc      60
accgcccagc gaggcgaccg ccgcgtaact cccctcgtgc tcgaccgca tcagcggcgt      120
cttgcggtatc tttccgctgc gcgcgccccg ggtggtgagc acgatgaccg gcagcccgggt      180
gtcccgcagc gtggtgccct tggtgcccc ggaactctcg tacagctcga cctgctcgcg      240
caccactgc gtcgggctgg gctcgtactc gccctcaagt ggcaagggat ccgtctcctt      300
cgtegggtccg gcggtgggtg ctccggacgg tcccaactcc cgcggccgcc cggatcatcc      360
gtaccgcatg ccccttcgcc cgagcgggtg atcacgttc cggccatccg gtcgtccgca      420
ccgcgagcac caggatcacg gcgctggaga gcagggccgt gaccagccgc ccccggtggc      480
ccgtcagggc gcgaccagc agcgcgcccc cgcgcgccag cagtagctgc cagtcgcgg      540
acgcggcgaa ggccgcccgc gcgaacaccg cccgtttcag cggccgtgcc gcaccggcgg      600
cgccgctgcc gagcaccagc gccacgaagt agaccaccgt catgggattg agcagggtga      660
tcccagagaag gccgagataa gcccctgccg cgcctggaac cggccgttcc gggcgggtgg      720
tgagccgatg ggcgcggtac tgccgcaggg cgagcagcgc cgcgcgagc gcgagcaccg      780
cgaggaccag cgccgaggcc cagcgcagcg ggtccagcac cggccgcagc tgtgccgca      840
gggcgccgcc gccacggtc gcgagcagcg cgtacagccc gtcggccgtg gcgacgccga      900
gcgcccgcga ggcgcccgtg cgcagcaggg tgcgggcggg gagggagacc agataggtcc      960
cgaccgcgcc gacgggcacc gcgatgccgt acccggcgag caggcccgcg agcagcgcgc      1020
ccgtcacggg cgtgcgggac tggttcctcc ggggacggcg gggctgctgt cggcccggca      1080
ccgcgggggc ggtggcagcg ggcgtcggca ggaggaggc tgtaggaggc atgggccgat      1140
cctggggccg ccgcgcccgc accggcaaat gaattacggc gcgttccagc ccccgccgg      1200
ctcgtcttc ggccacttca ccgcgtacgg cgatctggcc gaacttgctg tcgcccata      1260
ggtgcctcgg gcataaatg aagatcgga cgacgcacct ctctgtctgc gaggtcttc      1320
c atg acg gaa ctg acg gac atc acc ggc ccg ggg acc ccg gcc gaa      1366
Met Thr Glu Leu Thr Asp Ile Thr Gly Pro Gly Thr Pro Ala Glu
      1           5           10          15
ccc gtc gca ttc ccc cag gac cgc acc tgc ccc tac cac ccc ccc acc      1414
Pro Val Ala Phe Pro Gln Asp Arg Thr Cys Pro Tyr His Pro Pro Thr
      20           25           30
gga tac ggc ccg ctg cgc gac ggg cgc agc ctg tcc cgc gtc acc ctc      1462
Gly Tyr Gly Pro Leu Arg Asp Gly Arg Ser Leu Ser Arg Val Thr Leu
      35           40           45
ttc gac ggc cgc gag gtc tgg atg gtc acg ggc cac gcc acc gcc cgc      1510

```

Phe	Asp	Gly	Arg	Glu	Val	Trp	Met	Val	Thr	Gly	His	Ala	Thr	Ala	Arg	
		50					55					60				
gcg	ctg	ctc	gcg	gac	ccc	cgg	ctg	tcc	acc	gac	cgc	acc	ctc	ccg	ggc	1558
Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Arg	Leu	Ser	Thr	Asp	Arg	Thr	Leu	Pro	Gly	
		65					70					75				
ttc	ccc	gtg	ccc	acg	gcc	cgc	ttc	gcg	gcc	gtc	cgc	gac	cgg	cgg	gtg	1606
Phe	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Arg	Phe	Ala	Ala	Val	Arg	Asp	Arg	Arg	Val	
		80					85					90			95	
gcg	ctg	ctc	ggc	gtg	gac	gac	ccg	gtc	cac	cag	acc	cag	cgg	cgg	atg	1654
Ala	Leu	Leu	Gly	Val	Asp	Asp	Pro	Val	His	Gln	Thr	Gln	Arg	Arg	Met	
				100						105					110	
atg	atc	ccg	tcg	ttc	acc	ctc	aag	cgc	gcg	gcc	ggg	ctg	cgg	ccc	acc	1702
Met	Ile	Pro	Ser	Phe	Thr	Leu	Lys	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Arg	Pro	Thr	
			115					120						125		
atc	cag	cgg	acc	gtc	gac	ggg	ctg	ctg	gac	gcg	atg	atc	gag	aag	ggg	1750
Ile	Gln	Arg	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Leu	Asp	Ala	Met	Ile	Glu	Lys	Gly	
			130				135								140	
ccg	ccg	gcc	gag	ctg	gtc	tcc	gcc	ttc	gcc	ctg	ccc	gtg	ccc	tcg	gtg	1798
Pro	Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Ser	Ala	Phe	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Val	
			145				150					155				
gtc	atc	tgc	ggc	ctg	ctc	ggc	gtg	ccg	tac	gcc	gac	cac	gag	ttc	ttc	1846
Val	Ile	Cys	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Tyr	Ala	Asp	His	Glu	Phe	Phe	
						165					170				175	
gag	gaa	cag	tcc	cgc	acg	ctg	ctg	cgc	ggt	ccc	acg	gcc	gcc	gac	tcg	1894
Glu	Glu	Gln	Ser	Arg	Thr	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Ala	Asp	Ser	
				180					185						190	
caa	ggg	gcg	cgc	gag	cgg	ctc	gag	gag	tac	ctc	ggc	ggg	ctg	atc	gac	1942
Gln	Gly	Ala	Arg	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Ile	Asp	
			195						200				205			
gac	aag	gag	cgg	cag	gcc	gaa	ccc	ggc	gac	ggc	gtc	ctg	gac	gac	ctc	1990
Asp	Lys	Glu	Arg	Gln	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Gly	Val	Leu	Asp	Asp	Leu	
			210				215						220			
gtc	cac	cag	cgg	ctg	cgc	acc	ggc	gag	ctg	gac	cgg	cgc	gac	gtg	gtg	2038
Val	His	Gln	Arg	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	Leu	Asp	Arg	Arg	Asp	Val	Val	
			225				230					235				
gcg	ctg	gcc	gtc	atc	ctg	ctc	gtg	gcc	ggg	cac	gag	acg	acc	gcc	aac	2086
Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	His	Glu	Thr	Thr	Ala	Asn	
					245						250				255	
atg	atc	tcc	ctc	ggc	acc	tac	acg	ctg	ctg	cgg	cac	ccc	ggc	cgg	ctg	2134
Met	Ile	Ser	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Leu	Leu	Arg	His	Pro	Gly	Arg	Leu	
				260					265						270	
gcc	gag	ctg	cgc	gcc	gac	ccg	gcg	ctg	ctg	ccc	gcc	gcc	gtg	gag	gag	2182
Ala	Glu	Leu	Arg	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	
			275					280					285			
ctg	atg	cgg	atg	ctc	tcg	atc	gcg	gac	ggg	ctg	ctg	cgc	ctg	gcc	ctg	2230
Leu	Met	Arg	Met	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	
			290					295					300			
gag	gac	atc	gag	atc	gcc	ggc	gcc	acg	atc	cgg	gcc	ggc	gag	ggc	gtc	2278
Glu	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Ile	Arg	Ala	Gly	Glu	Gly	Val	
			305				310						315			

ctg ttc tcc acc tcg ctg atc aac cgc gac gag tcc gtg ttc gac gac	2326
Leu Phe Ser Thr Ser Leu Ile Asn Arg Asp Glu Ser Val Phe Asp Asp	
320 325 330 335	
ccc gac acc ctg gac ttc cac cgc tcc acc cgc cac cac gtg gcc ttc	2374
Pro Asp Thr Leu Asp Phe His Arg Ser Thr Arg His His Val Ala Phe	
340 345 350	
ggt ttc ggc atc cac cag tgc ctg ggc cag aac ctg gcc cgc gcc gag	2422
Gly Phe Gly Ile His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu Ala Arg Ala Glu	
355 360 365	
ctg gag atc gcc ctg ggc acg ctc ctg gag cgg ctc ccc ggc ctc cgg	2470
Leu Glu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Glu Arg Leu Pro Gly Leu Arg	
370 375 380	
ctg gcc gcg ccc gcc gag gag atc ccg ttc aaa ccc ggc gac acg atc	2518
Leu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Ile Pro Phe Lys Pro Gly Asp Thr Ile	
385 390 395	
cag ggg atg ctg gaa ctc ccc gtg acc tgg taa gaggctctgg tc atg cac	2569
Gln Gly Met Leu Glu Leu Pro Val Thr Trp Met His	
400 405 410	
atc gac atc gac aag gac cgc tgc atc ggc gcc ggc cag tgc gcg ctg	2617
Ile Asp Ile Asp Lys Asp Arg Cys Ile Gly Ala Gly Gln Cys Ala Leu	
415 420 425	
gcc gcc ccg ggc gtg ttc acc cag gac gac gac ggc tac agc acc ctg	2665
Ala Ala Pro Gly Val Phe Thr Gln Asp Asp Asp Gly Tyr Ser Thr Leu	
430 435 440	
ctc ccc ggc cgc gag gac ggc ggg ggc gac ccg atg gtc cgg gag gcg	2713
Leu Pro Gly Arg Glu Asp Gly Gly Gly Asp Pro Met Val Arg Glu Ala	
445 450 455	
gcc cgc gcc tgc ccg gtg agc gcc atc cgg gtg acc gaa ccg gcc ggc	2761
Ala Arg Ala Cys Pro Val Ser Ala Ile Arg Val Thr Glu Pro Ala Gly	
460 465 470 475	
tga ggccggggccc ggcggccgcg gcccgctgcc gggaccgccg ttcccagttc agtagg	2820
gtcgtgcat gacctcacag gccgggaagc ccttcctcta cgtcgtcgtc tgccgggccg	2880
ggaccgccgc cggagtcacc acgtgatcg gcgccgccca ggccgggggc tgggaggtgg	2940
gggtcctggc cacgccgtg gcgatgggcg ggttcttcga cacggctgcg gtcaggaga	3000
tgacgggccg gccatccgc tcggcctggc gtcgccggc cgatccgcgc ccgttccgc	3060
cgccgggcgc cgtggtggtg gcgccgccca cttcaaacac cgtcaacaag tggcgggccg	3120
gtctcgccga cacgtcgcg gtccgcacgc tctgcgaggc ggccggcctc ggctgcccga	3180
tcgccgtcct gccctgcgtg gcggacgcgc tggccgccca ccccgctac cgggagggcc	3240
ttctccggct gcgtgggatg ggcgtccgt tggcgagcc gtacgccggc ccgccggggg	3300
aggacggcga ggcggacggc gcacggcccg ggttcgcctg ggagaacgcc ctggacctgc	3360
tggagcgggc ctgaaccgc tccccgacct gtagggcctg tctgacactg tcagacaggc	3420
cctaaccgca ggtcagcgc ggccgggcc gcatgccgc ggtgtagagg tcctggcccc	3480
gcggcagcca gtagccagc ctggagacca ccgtggagca gtcaggccc acggtgacgc	3540
ggaccttcac cgtctcggga cggccgggct gcagcgcggt cagcgcgcag tccaggaggt	3600
acgcgagccg ggtcttcgag gtaccggccg accagcgggt tgacgcagcg ggcgtcgtcc	3660
gtggcgatcc gcaccccggt gcccgcccc ccgatgagtc cgagccgggc gctgccgtcg	3720
ccctcgtcgc tgtccggcg gaccgtgtag gtcagcgtgg tgggtggcgtc gcgccgcagg	3780

gtgtccggtc gac

3793

<210> 2  
 <211> 2329  
 <212> DNA  
 <213> Streptomyces sp.  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (420)..(1604)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1643)..(1834)  
 <400> 2

ggatccacgg gtggccgccc cgctcgcccc ggtgaccgac cggcgatatcg gctatgtcgc 60  
 cgcgctcttc gcggcgctgg gcttccccga gggcgaggcg cgggaccgcg gcctgctggc 120  
 gtacaccgcc tacctcggcc acaccagct cggacatgcc gtccgacaga gcctgccggc 180  
 cgaggcggca cacgaccgct atctggatgg cgtgatcgac accctcgtag ggccgcggga 240  
 cggaggcgat gaagccgaac atgtcacaat ctgaacgagg ttggcggaac tgcgcgcaga 300  
 acatgcccgg tatccgcggc atgaggtgag atcggcgcgcg cgaaacacgg tgcgccacag 360  
 cgttgccatc tcacacacga gcaactcgag ccacttgaga ctcgtacggg aggaaattc 419

gtg acc gaa gcc atc ccc tac ttt cag aac cgc acc tgt ccc tac cac 467  
 Val Thr Glu Ala Ile Pro Tyr Phe Gln Asn Arg Thr Cys Pro Tyr His

1 5 10 15  
 ccg ccc gcc gcc tat cag cca ctg cgc ggg gcc ggc ccg ctg agc cat 515  
 Pro Pro Ala Ala Tyr Gln Pro Leu Arg Gly Ala Gly Pro Leu Ser His  
 20 25 30

gtc acg ttc tac gac ggc cgg aag gtg tgg gcg gtc acc ggc cac ccc 563  
 Val Thr Phe Tyr Asp Gly Arg Lys Val Trp Ala Val Thr Gly His Pro  
 35 40 45

gag gca cgg gcg ctg ctg acc gac cag cga ctc tcc gcc gac cgg cag 611  
 Glu Ala Arg Ala Leu Leu Thr Asp Gln Arg Leu Ser Ala Asp Arg Gln  
 50 55 60

aac ccg gcc ttc ccg gtc ccc ttc gaa cgc ttc gcg gcc atc cgc cgg 659  
 Asn Pro Ala Phe Pro Val Pro Phe Glu Arg Phe Ala Ala Ile Arg Arg  
 65 70 75 80

gtc cgg acg ccg ctg atc ggg gtc gac gac ccg gag cac aac acc cag 707  
 Val Arg Thr Pro Leu Ile Gly Val Asp Asp Pro Glu His Asn Thr Gln  
 85 90 95

cgc cgg atg ctg atc ccc agc ttc agc ctc aag cgg acc gcc gca ctg 755  
 Arg Arg Met Leu Ile Pro Ser Phe Ser Leu Lys Arg Thr Ala Ala Leu  
 100 105 110

cgg ccg gag atc cag cgg atc gtc gac ggg ctg ctc gac cgg atg ctg 803  
 Arg Pro Glu Ile Gln Arg Ile Val Asp Gly Leu Leu Asp Arg Met Leu  
 115 120 125

gat cag ggc ccg ccc acc gag ctg gtc tcc gcg ttc gcc ctg ccg gtc 851  
 Asp Gln Gly Pro Pro Thr Glu Leu Val Ser Ala Phe Ala Leu Pro Val  
 130 135 140

ccg tcg atg gtg atc tgc gca ctg ctc gga gtc tca tac gcc gac cat 899  
 Pro Ser Met Val Ile Cys Ala Leu Leu Gly Val Ser Tyr Ala Asp His

145	150	155	160	
gag ttc ttc gag gag gag tcc cgc cgc atc ctg cgc ggc cgg tcg gcc				947
Glu Phe Phe Glu Glu Glu Ser Arg Arg Ile Leu Arg Gly Arg Ser Ala				
	165	170	175	
gag gag gcg gag gac gcc cgg ctg aag ctg gag gag tac ttc acc ggg				995
Glu Glu Ala Glu Asp Ala Arg Leu Lys Leu Glu Glu Tyr Phe Thr Gly				
	180	185	190	
ctg atc gcc gcc aag gag aag aac ccg ggc gac ggg ctg ctg gac gag				1043
Leu Ile Ala Ala Lys Glu Lys Asn Pro Gly Asp Gly Leu Leu Asp Glu				
	195	200	205	
ctg atc gag gac cgg ctg cgg acc ggc gcg ctc acc cgc gac gag ctg				1091
Leu Ile Glu Asp Arg Leu Arg Thr Gly Ala Leu Thr Arg Asp Glu Leu				
	210	215	220	
gtc cgg ctc gcc atg atc ctg ctg gtg gcc ggc cat gag acc acc gcc				1139
Val Arg Leu Ala Met Ile Leu Leu Val Ala Gly His Glu Thr Thr Ala				
	225	230	235	240
aac atg atc tcg ctc ggc acc ttc acc ctg ctg gac cac ccc gag cag				1187
Asn Met Ile Ser Leu Gly Thr Phe Thr Leu Leu Asp His Pro Glu Gln				
	245	250	255	
ctg gcg cag ctc aag gcc gac gag ggc ctg atg ccg gcc gcc atc gag				1235
Leu Ala Gln Leu Lys Ala Asp Glu Gly Leu Met Pro Ala Ala Ile Glu				
	260	265	270	
gag ctg ctg cga ttc ctg tcc atc gcg gac ggc ctg ctg cgg gtg gcg				1283
Glu Leu Leu Arg Phe Leu Ser Ile Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala				
	275	280	285	
acg gag gac atc gag atc ggc ggt cag gtg atc cgg gcc gac gac gcg				1331
Thr Glu Asp Ile Glu Ile Gly Gly Gln Val Ile Arg Ala Asp Asp Ala				
	290	295	300	
gtc ctg ttc ccc gcc tca ctg atc aac cgg gac gag gcc gcc tat ccg				1379
Val Leu Phe Pro Ala Ser Leu Ile Asn Arg Asp Glu Ala Ala Tyr Pro				
	305	310	315	320
gca ccc gac gag ctg gac ctc ggc cgt tcg gcc cgc cat cac gtg gcg				1427
Ala Pro Asp Glu Leu Asp Leu Gly Arg Ser Ala Arg His His Val Ala				
	325	330	335	
tcc ggc ttc ggg atc cac cag tgc ctg ggg cag aac ctc gcc cgc gcg				1475
Ser Gly Phe Gly Ile His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu Ala Arg Ala				
	340	345	350	
gag atg gag atc gcg ctg cgc tca ctg ttc acc agg atc ccg cag ctg				1523
Glu Met Glu Ile Ala Leu Arg Ser Leu Phe Thr Arg Ile Pro Gln Leu				
	355	360	365	
cgg ctc gcc gtg ccg gcc gcc gag att ccg ttc aag gac gga gac acc				1571
Arg Leu Ala Val Pro Ala Ala Glu Ile Pro Phe Lys Asp Gly Asp Thr				
	370	375	380	
ctg caa ggc atg atc gaa ctg ccg ctg gcc tgg tag cagccaggac ggcaga				1623
Leu Gln Gly Met Ile Glu Leu Pro Leu Ala Trp				
	385	390	395	
ccaaagaaag ggggtccgga atg cgg atc gcg atc gac acc gac cgc tgt atc				1675
Met Arg Ile Ala Ile Asp Thr Asp Arg Cys Ile				
	400	405		
ggc gcc ggc cag tgt gcc ctg acc gcg ccc ggg ggt ttc acc cag gat				1723



Gly	Ala	Gly	Gln	Cys	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Thr	Gln	Asp				
						410							415					420	
gac	gac	ggc	ttc	agt	gca	ctg	ctg	ccc	ggc	cgc	gag	gac	ggc	gcc	ggc	1771			
Asp	Asp	Gly	Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly				
						425							430					435	
gac	ccg	ctg	gtg	cgc	gaa	gcc	gcc	cgc	gcc	tgc	ccc	gtg	cag	gcc	att	1819			
Asp	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Ala	Ile				
						440							445					450	
gcg	gtc	acc	gac	gat	tag	cagcaccccc	gcggacgacc				cggcagacgc				gcgcggcc		1875		
Ala	Val	Thr	Asp	Asp															
455																			
ccggctgaca		cccggcgccc		gaggcgcgcc		cgagccgtcc		gcccctccac		ttgtccctac							1935		
ggcatccacc		ccatccgcta		ccgcaacacc		ccttgggtga		cgggcagttd		cgaggacctcc							1995		
ggttgtcccc		ggcggtactg		gtgaccgtca		ccggcttcac		gccgcgattg		cccacatagg							2055		
cgtcgtcgct		cgccggcgatc		acgaagcgcg		gtcgggtgcc		cggtctcgtaa		cggtgcacga							2115		
tgccccggcg		ttccacgggtg		aacccgcccggg		ccacatccggg		cacccggggcc		ggggccacca							2175		
acaggtgcac		cagcgtcttc		ctgccgttgc		gcgcgacatc		gtagagcttg		gcgaacagca							2235		
ccagcttgct		cgccgcaccc		gcggaccgct		gcgcccgcgc		ggcctgcggc		gaggcaacct							2295		
tcagcgtcac		cctcggcgcg		cccaccacgt		cgac											2329		

```
<210> 3
<211> 1860
<212> DNA
<213> Unknown (A-1560株)
<220>
<221> CDS
<222> (172)..(1383)
<220>
<221> CDS
<222> (1399)..(1593)
<400> 3
```

cggggatcgt	acgccgtacc	gtttcggggc	aaccgaatta	cgatgcggaa	tggatggttc		60
ccagccagat	cccgcaggta	gccgatctgg	ccgaacttga	tgtcgtgcac	tggatgcctc		120
gggcatctaa	tgaagatcgg	cacgacgcat	ccttcgtctg	cgaggtctcc	c atg aca		177
					Met Thr		
					1		
gac acg aca gac ctg acc gag ctg tca gat ccc gtc tcc ttc ccc cag							225
Asp Thr Thr Asp Leu Thr Glu Leu Ser Asp Pro Val Ser Phe Pro Gln							
	5				10		
						15	
gac cgg agc tgc ccc tac cac ccg ccc acc ggg tac gac ccg ctg cgc							273
Asp Arg Ser Cys Pro Tyr His Pro Pro Thr Gly Tyr Asp Pro Leu Arg							
	20				25		
						30	
acc gaa cgg ccg ccc gcc cgc atc cgg ctc tac gac ggc cgc ccc gcc							321
Thr Glu Arg Pro Pro Ala Arg Ile Arg Leu Tyr Asp Gly Arg Pro Ala							
	35				40		
						45	
							50
tgg ctc gtc acc ggc cac gcc gtc gcc cgt gac ctg ctg gtc gac ccc							369
Trp Leu Val Thr Gly His Ala Val Ala Arg Asp Leu Leu Val Asp Pro							
			55				60
							65
cgc ctg tcc acg gac cgc acc cgc tcg ggc ttc ccg gcc aca act ccc							417
Arg Leu Ser Thr Asp Arg Thr Arg Ser Gly Phe Pro Ala Thr Thr Pro							

			70			75			80							
cgc	ttc	gcc	gcg	gtc	cgc	gac	cgc	aag	ccg	gcg	ctc	ctc	ggc	gtc	gac	465
Arg	Phe	Ala	Ala	Val	Arg	Asp	Arg	Lys	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Val	Asp	
			85				90				95					
gac	ccc	aag	cac	cgc	acc	cag	cgg	tgg	atg	atg	atc	ccg	agc	ttc	acc	513
Asp	Pro	Lys	His	Arg	Thr	Gln	Arg	Trp	Met	Met	Ile	Pro	Ser	Phe	Thr	
			100				105				110					
ctc	agg	cgc	gcc	acc	gag	ctc	agg	ccg	cgc	atc	cag	gag	atc	gtc	gac	561
Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Leu	Arg	Pro	Arg	Ile	Gln	Glu	Ile	Val	Asp	
115							120				125				130	
gaa	ctg	ctg	gac	gtg	atg	atc	gcc	cag	gga	ccc	ccg	gcc	gac	ctg	gtg	609
Glu	Leu	Leu	Asp	Val	Met	Ile	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Val	
			135				140				145					
cgt	tcc	ttc	gcg	ctg	ccg	gtg	ccg	tcc	atg	gtg	atc	tgc	gcc	ctg	ctc	657
Arg	Ser	Phe	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Met	Val	Ile	Cys	Ala	Leu	Leu	
			150				155				160					
ggc	gtg	ccc	tac	gcc	gac	cac	gag	ttc	ttc	gag	gac	cag	tcc	agg	cgg	705
Gly	Val	Pro	Tyr	Ala	Asp	His	Glu	Phe	Phe	Glu	Asp	Gln	Ser	Arg	Arg	
			165				170				175					
ctg	ctg	cgc	gga	ccg	gcg	gcc	gag	gac	acg	cag	gac	gcc	cgg	gac	cgg	753
Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Asp	Thr	Gln	Asp	Ala	Arg	Asp	Arg	
			180				185				190					
ctc	gcc	gcg	tac	ctg	gag	gac	ctg	atc	gac	gag	aag	cgg	cgc	cgg	ccc	801
Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Asp	Leu	Ile	Asp	Glu	Lys	Arg	Arg	Arg	Pro	
195							200				205				210	
ggg	gac	ggc	ctg	ctg	gac	gaa	ctc	gtc	cag	cag	cgt	ctg	aac	gaa	ggc	849
Gly	Asp	Gly	Leu	Leu	Asp	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Glu	Gly	
			215				220				225					
gag	ctc	gac	cgg	gag	gaa	ctg	acc	gcg	ctg	gcg	atg	atc	ctg	ctg	gtc	897
Glu	Leu	Asp	Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Met	Ile	Leu	Leu	Val	
			230				235				240					
gcg	ggc	cac	gag	acc	acc	gcc	aac	atg	atc	tcc	ctg	ggc	acc	tac	acg	945
Ala	Gly	His	Glu	Thr	Thr	Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	
			245				250				255					
ctc	ctg	ctg	cac	ccc	gaa	cgg	ctg	acc	gag	ctg	cgc	gcc	gac	ccc	gcg	993
Leu	Leu	Leu	His	Pro	Glu	Arg	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Ala	Asp	Pro	Ala	
			260				265				270					
ctg	ctg	ccg	gcc	gcc	gtc	gag	gaa	ctg	atg	cgg	atg	ctg	tcc	atc	gcg	1041
Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Leu	Met	Arg	Met	Leu	Ser	Ile	Ala	
275							280				285				290	
gac	gga	ctg	ctg	cgg	cag	gcc	acc	gag	gac	atc	gag	atc	gcc	ggg	acc	1089
Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Thr	Glu	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Gly	Thr	
			295				300				305					
acc	atc	agg	gcc	ggg	gac	ggc	gtg	gtc	ttc	tcc	acc	tct	gtc	atc	aac	1137
Thr	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	Val	Val	Phe	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	
			310				315				320					
cgc	gac	gag	gac	gtc	tac	ccg	gcc	ccc	gac	acc	ctc	gac	ttc	cac	cgc	1185
Arg	Asp	Glu	Asp	Val	Tyr	Pro	Ala	Pro	Asp	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Arg	
			325				330				335					
tcg	acc	cgc	cac	cac	gtc	gcc	ttc	ggg	ttc	gga	atc	cac	cag	tgc	ctc	1233

```

Ser Thr Arg His His Val Ala Phe Gly Phe Gly Ile His Gln Cys Leu
 340                      345                      350
ggc cag aac ctc gcc cgc acc gaa ctg gag atc gcc ctg cgc acg ctc      1281
Gly Gln Asn Leu Ala Arg Thr Glu Leu Glu Ile Ala Leu Arg Thr Leu
 355                      360                      365                      370
ctc gaa cgg ctg ccc acg ctc cgg ctc gcc gcc cca ccg gag gaa atc      1329
Leu Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Leu Ala Ala Pro Pro Glu Glu Ile
                      375                      380                      385
ccc ttc aaa ccc gcc gac acc atc cag ggg atg ctg gaa ctc ccc gtc      1377
Pro Phe Lys Pro Gly Asp Thr Ile Gln Gly Met Leu Glu Leu Pro Val
                      390                      395                      400
agc tgg taa gaggctgccg tc atg cat atc gag atc gac aag gac cgc tgc      1428
Ser Trp                      Met His Ile Glu Ile Asp Lys Asp Arg Cys
                      405                      410
atc ggc gcc gga cag tgc gcc ctg acc gcc ccg ggt gtg ttc acc cag      1476
Ile Gly Ala Gly Gln Cys Ala Leu Thr Ala Pro Gly Val Phe Thr Gln
                      420                      425                      430
gac gac gac gcc ttc agt gac ctg ttg ccc gcc cgg gag gac gcc gcc      1524
Asp Asp Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Pro Gly Arg Glu Asp Gly Ala
 415                      435                      440                      445
ggc gac ccg atg gtc cgg gag gcc gcc agg gcc tgc ccc gtg agt gcc      1572
Gly Asp Pro Met Val Arg Glu Ala Ala Arg Ala Cys Pro Val Ser Ala
                      450                      455                      460
atc acg ctg tcc gag gac ggg tag ggggccgagc cgcgccgcc gccggtccgc      1626
Ile Thr Leu Ser Glu Asp Gly
                      465
tgccgcggcg ccgtgccgac gcggcggccg gccggcccgt ccggtgccccg tcgcgtgcc      1686
ccgtggcccc ggccggcggct gattgactag gggtcccggg tgagcgaaca ggcccagaag      1746
ccctccgggg cgcgcgccgc gaaagacacc gggacggcgc ccgggaaacc ctttctcta      1806
cgtcgtcgtc tgcgccgcc gcacgccga aggcgtcagc aagctgatca ccgc      1860

<210>      4
<211>      29
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      STRANDNESS : single
<220>
<223>      TOPOLOGY : linear
<220>
<223>      Description of Artificial Sequence : 5Dm-3F Primer
<400>      4
ttcgcsctsc csgtcccstc satgtsat      29

<210>      5
<211>      21
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      STRANDNESS : single

```

<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 5Dm-3R Primer  
<400> 5  
gttgatsays gasgtsgaga a 21

<210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 6PIN-2F Primer  
<400> 6  
gctg'gcctg gccctggagg acatcgagat 30

<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 6PIN-2R Primer  
<400> 7  
ctgttcctcg aagaactcgt ggtcggcgta 30

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : DM-NdeF Primer  
<400> 8  
gccccatat gacggaactg acggacatca 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : DM-SpeR Primer  
<400> 9  
gggccactag tcagccggcc gggttcggtca 30

<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : DM-BglF Primer  
<400> 10  
cgcatagatc ttcacccgag cgggtgatca 30

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : DM-BglR Primer  
<400> 11  
tcccagatc ttgaaggtcc gcgtcacgt 30

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 5D-1R Primer  
<400> 12  
aggtgcccag cgagatcatg tt 22

<210> 13  
<211> 30

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 7PIN-2F Primer  
<400> 13  
ccatgatcct gctggtggcc ggccatgaga 30

<210> 14  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 07-NdeF Primer  
<400> 14  
gccccatatg accgaagcca tcccctactt 30

<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 07-SpeR Primer  
<400> 15  
gccactagt g ctaatcg tgc gtagccgcaa 30

<210> 16  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 5Dm-2R Primer  
<400> 16  
ctggatsgtg tcscsggyt t 21

<210> 17  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : 5PIN-2F Primer  
<400> 17  
cggaatccac cagtgcctcg gccagaacct 30

<210> 18  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : tpm-NdeF Primer  
<400> 18  
ggccccatat gacagacacg acagacctga 30

<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> STRANDNESS : single  
<220>  
<223> TOPOLOGY : linear  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence : tpm-SpeR Primer  
<400> 19  
gcgcgactag tccccctacc cgtcctcgga 30

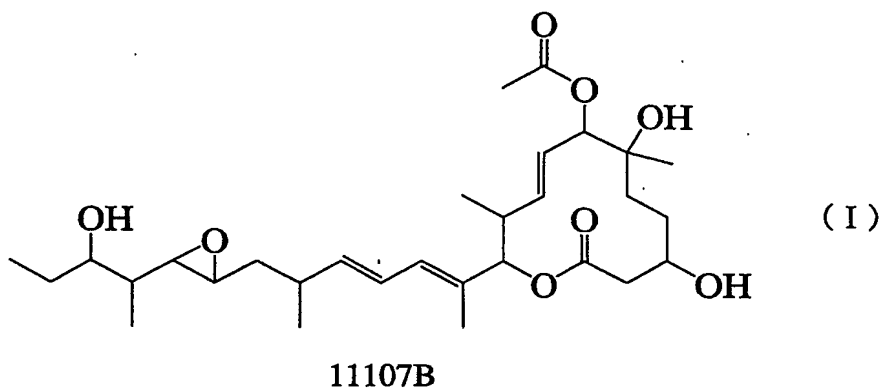
## 【書類名】 要約書

## 【要約】

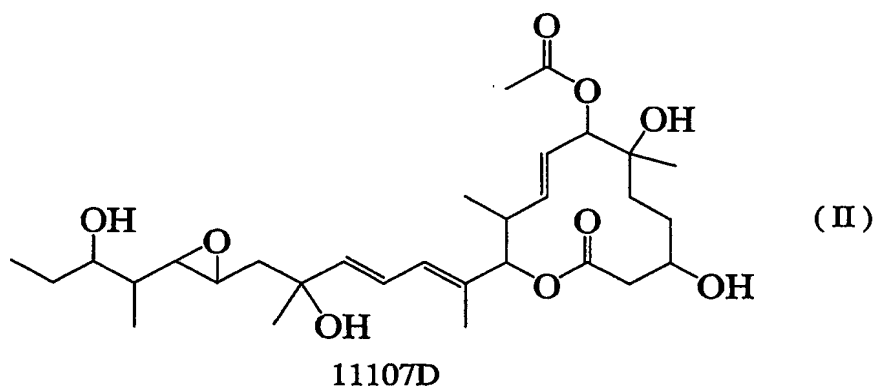
【課題】 マクロライド系化合物11107Bの水酸化に関与するDNA、及びマクロライド系化合物11107Dの新規な生産方法の提供。

【解決手段】 式(I)で示されるマクロライド系化合物11107Bの、式(II)で示される16位水酸化マクロライド系化合物11107Dへの生物学的変換に関与するDNAであって、16位水酸化酵素活性を有するタンパク質またはフェレドキシンをコードするDNA、その単離方法、そのDNAによりコードされるタンパク質、そのDNAを担持するプラスミド、そのプラスミドで形質転換した形質転換体、その形質転換体を用いた16位水酸化マクロライド系化合物の生産方法。

## 【化1】



## 【化2】



## 【選択図】 なし



特願 2003-396828

出願人履歴情報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社

特願 2 0 0 3 - 3 9 6 8 2 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 1 5 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号

氏 名

メルシャン株式会社